



Universitat de Girona

EFECTES DEL FOTOPERÍODE SOBRE LA QUALITAT
ESPERMÀTICA DE MASCLES PORCINS SUS
DOMESTICUS

Sílvia SANCHO BADELL

ISBN: 84-688-6954-6
Dipòsit legal: GI-467-2004

EFECTES DEL FOTOPERÍODE SOBRE
LA QUALITAT ESPERMÀTICA
DE MASCLES PORCINS
Sus domesticus

Sílvia Sancho Badell

Departament de Biologia
UNIVERSITAT DE GIRONA

2002

Departament de Biologia
UNIVERSITAT DE GIRONA

EFECTES DEL FOTOPERÍODE SOBRE LA QUALITAT ESPERMÀTICA DE MASCLES PORCINS *Sus domesticus*

Memòria que presenta Sílvia Sancho Badell per
optar al grau de Doctor en Biologia per la
Universitat de Girona

Vist-i-plau del director de la memòria, Dr. Sergi Bonet
Marull, catedràtic d'universitat del Departament Biologia de
la Universitat de Girona

Dr. Sergi Bonet Marull

Girona, 2002

AGRAÏMENTS

Aquest estudi ha estat possible gràcies al finançament atorgat per la CICYT (projecte AGF-98/0633).

Vull manifestar el meu agraïment a totes les persones que m'han ajudat en l'elaboració d'aquest treball; en especial al Dr. Sergi Bonet i a la Dra. Elisabet Pinart per la seva inestimable direcció científica i per tenir confiança en mi en tot moment. A les meves companyes del grup de Biologia de la Reproducció: la Mailo, la Núria, l'Elena, la Judit, l'Anna i l'Elisabeth per la seva immensa col·laboració en la recollida de mostres, comptatges al microscopi, resolució de dubtes, orientació alhora de redactar la tesi i en definitiva ajudar-me en tots els aspectes en què anava perduda i fer tots els favors que els he demanat, a més pel seu recolzament i bon humor del dia a dia.

També vull agrair a l'Emili Garcia del departament de Ciències Ambientals de la Universitat de Girona l'assessorament en el tractament estadístic de les dades d'aquesta memòria i a la Cesca Ribas la seva ajuda quan li ho he demanat.

A la Maria Jesús Palomo, a en Joan Ballester i a en Joan Enric Rodríguez-Gil, del departament de Biologia de la Reproducció de la Universitat Autònoma de Barcelona, per les proves bioquímiques realitzades en l'anàlisi del semen, així com pel seu assessorament científic i personal.

A l'empresa de selecció i multiplicació porcina Soragi, S.L. de Siurana d'Empordà que va cedir les instal·lacions i va subministrar els mascles; molt especialment a en Ramon Joher i a en Salvador González per proporcionar-me les mostres cada dilluns i dijous durant pràcticament dos anys, i a tothom que directe o indirectament ha participat en aquest estudi.

A l'Eva i a l'Ester, les amigues de tota la vida, per ajudar-me a desconnectar en els moments necessaris.

A la família del meu marit per la seva bona predisposició a l'hora d'ajudar i per la seva disponibilitat quan ho he necessitat.

A la meva família per tot el suport moral i pràctic que m'han proporcionat sempre al llarg de tots aquests anys; en especial a la meva mare pel seu ajut desinteressat en tot moment i al meu avi per la seva confiança en mi.

A l'Emilio per tota la seva col·laboració, especialment per acompanyar-me moltes vegades a la recollida de mostres i sobretot per aguantar-me el meu mal humor en els dies difícils.

Molt especialment als "meus petitons" Roger i Guillem que són, sense dubte, el més important que m'ha succeït a la vida.

Finalment, disculpeu-me si em deixo algú i si és així accepteu també el meu agraïment.

ÍNDEX

<u>INTRODUCCIÓ</u>	1
1. Objectius del treball i organització de la memòria	1
1.1. Objectius del treball experimental	1
1.2. Organització de la memòria	3
2. El mascle porcí: fisiologia reproductiva i característiques de l'ejaculat	4
2.1. Aspectes relacionats amb la regulació de la funció reproductora	6
2.1.1. Les estructures endocrines i les seves funcions	6
2.1.2. El ritme circadià de llum-foscor	12
2.1.3. La reproducció estacional	14
2.1.4. L'ancestre del porc domèstic (<i>Sus domesticus</i>): el porc salvatge (<i>Sus scrofa</i>)	15
2.2. L'espermatogènesi i la maduració epididimària	16
2.3. L'ejaculat	17
2.4. L'espermatozoide	20
2.5. Factors que afecten la funció reproductiva	21
2.5.1. Factors fisiològics	22
2.5.2. Factors ambientals	23
2.5.3. Factors de confinament	26
2.6. Obtenció de mostres i conservació del semen	29
2.7. Anàlisi microscòpica i bioquímica de l'ejaculat	32
2.7.1. El volum seminal	32
2.7.2. El pH seminal	32
2.7.3. La concentració espermàtica	33
2.7.4. La vitalitat espermàtica	34
2.7.5. La motilitat espermàtica	35
2.7.6. La resistència osmòtica de l'acrosoma	36
2.7.7. La morfologia espermàtica	36
2.7.8. La producció espermàtica	39
2.7.9. El contingut de sucres i proteïnes del plasma seminal	40
2.7.10. La fertilitat i la prolificitat	41

3. El mascle reproductor porcí: efectes del fotoperíode en la funció reproductora	44
3.1. L'estat actual de les investigacions	44
3.2. El grau d'innovació del present estudi	45
4. El sector porcí: organització i incidència en el mercat càrnic	45
<u>MATERIAL I MÈTODES</u>	49
1. Aspectes previs	49
2. Disseny experimental i pla de treball	51
3. Material	54
3.1. Característiques dels mascles i obtenció del semen	54
3.2. Característiques de la nau experimental	55
4. Mètodes	57
4.1. Anàlisi de la qualitat seminal	57
4.1.1. Determinació del volum i el pH del semen	57
4.1.2. Anàlisi microscòpica del semen	57
4.1.2.1. Concentració espermàtica	58
4.1.2.2. Vitalitat espermàtica	59
4.1.2.3. Motilitat espermàtica	60
4.1.2.4. Resistència osmòtica dels acrosomes	61
4.1.2.5. Morfologia espermàtica	62
4.1.2.6. Producció espermàtica	63
4.1.2.7. Nombre de dosis seminals	63
4.2. Anàlisi bioquímica del semen	64
4.2.1. Determinació del contingut de proteïna total	64
4.2.2. Identificació de les proteïnes amb residus fosoforil·lats de tirosina	64
4.2.2.1. Electroforesi	64
4.2.2.2. Tinció amb Roig de Ponceau	65
4.2.2.3. Western Immunoblotting	66
4.2.3. Determinació del contingut de fructosa, glucosa i sorbitol del plasma seminal	66
4.3. Estudi de la fertilitat i prolificitat dels mascles	67

Capítol 1: <u>QUALITAT ESPERMÀTICA</u>	
<u>DE L'EJACULAT DE MASCLES EXPOSATS</u>	
<u>A CONDICIONS AMBIENTALS DE</u>	
<u>PRIMAVERA I TARDOR</u>	69
RESULTATS	69
1. Estudi comparatiu del volum seminal	69
2. Estudi comparatiu del pH seminal	70
3. Estudi comparatiu de la concentració espermàtica	70
4. Estudi comparatiu de la vitalitat espermàtica	70
5. Estudi comparatiu de la motilitat espermàtica	71
6. Estudi comparatiu de la resistència osmòtica	71
6.1. Medi isotònic	71
6.2. Medi hipotònic	71
7. Estudi comparatiu de la morfologia espermàtica	72
7.1. Espermatozoides madurs	72
7.2. Espermatozoides immadurs	72
7.2.1. Gota citoplasmàtica proximal	73
7.2.2. Gota citoplasmàtica distal	73
7.3. Espermatozoides aberrants	73
7.3.1. Anomalies en la forma del cap	74
7.3.2. Anomalies en la mida del cap	74
7.3.3. Anomalies en el nombre de caps	74
7.3.4. Anomalies en la forma de la cua	75
7.3.5. Anomalies en la mida de la cua	75
7.3.6. Anomalies en el nombre de cues	75
8. Estudi comparatiu de la producció espermàtica	76
9. Estudi comparatiu del nombre de dosis seminals	76
10. Taula i gràfics	77
DISCUSSIÓ	83

Capítol 2: QUALITAT DEL SEMEN I FERTILITAT

DE MASCLES EXPOSATS A CONDICIONS

EXPERIMENTALS DE 24, 12 I 0 HORES

<u>DE LLUM ARTIFICIAL</u>	91
RESULTATS	91
1. Estudi comparatiu del volum seminal	91
1.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	91
1.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	92
1.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	92
1.4. Comparacions entre grups	93
2. Estudi comparatiu del pH seminal	94
2.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	94
2.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	94
2.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	94
2.4. Comparacions entre grups	95
3. Estudi comparatiu de la concentració espermàtica	96
3.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	96
3.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	97
3.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	97
3.4. Comparacions entre grups	98
4. Estudi comparatiu de la vitalitat espermàtica	99
4.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	99
4.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	100
4.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	100
4.4. Comparacions entre grups	101
5. Estudi comparatiu de la motilitat espermàtica	102
5.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	102
5.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	102
5.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	102
5.4. Comparacions entre grups	104

6. Estudi comparatiu de la resistència osmòtica dels acrosomes	104
6.1. Medi isotònic	104
6.1.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	104
6.1.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	105
6.1.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	105
6.1.4. Comparacions entre grups	105
6.2. Medi hipotònic	107
6.2.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	107
6.2.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	107
6.2.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	107
6.2.4. Comparacions entre grups	108
7. Estudi comparatiu de la morfologia espermàtica	109
7.1. Espermatozoides madurs	109
7.1.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	109
7.1.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	110
7.1.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	110
7.1.4. Comparacions entre grups	112
7.2. Espermatozoides immadurs	112
7.2.1. Gota citoplasmàtica proximal	112
7.2.1.1. <i>Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial</i>	112
7.2.1.2. <i>Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial</i>	112
7.2.1.3. <i>Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial</i>	113
7.2.1.4. <i>Comparacions entre grups</i>	114
7.2.2. Gota citoplasmàtica distal	115
7.2.2.1. <i>Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial</i>	115
7.2.2.2. <i>Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial</i>	115
7.2.2.3. <i>Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial</i>	116
7.2.2.4. <i>Comparacions entre grups</i>	116
7.3. Espermatozoides aberrants	118
7.3.1. Espermatozoides amb anomalies en la forma del cap	118
7.3.1.1. <i>Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial</i>	118
7.3.1.2. <i>Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial</i>	118
7.3.1.3. <i>Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial</i>	118
7.3.1.4. <i>Comparacions entre grups</i>	120
7.3.2. Espermatozoides amb anomalies en la mida del cap	120
7.3.2.1. <i>Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial</i>	120
7.3.2.2. <i>Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial</i>	121
7.3.2.3. <i>Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial</i>	121
7.3.2.4. <i>Comparacions entre grups</i>	121
7.3.3. Espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps	123
7.3.3.1. <i>Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial</i>	123
7.3.3.2. <i>Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial</i>	124
7.3.3.3. <i>Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial</i>	124
7.3.3.4. <i>Comparacions entre grups</i>	124

7.3.4. Espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua	126
7.3.4.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	126
7.3.4.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	127
7.3.4.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	127
7.3.4.4. Comparacions entre grups	127
7.3.5. Espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua	129
7.3.5.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	129
7.3.5.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	130
7.3.5.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	130
7.3.5.4. Comparacions entre grups	132
7.3.6. Espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues	132
7.3.6.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	132
7.3.6.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	133
7.3.6.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	133
7.3.6.4. Comparacions entre grups	134
8. Estudi comparatiu de la producció espermàtica	135
8.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	135
8.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	136
8.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	136
8.4. Comparacions entre grups	138
9. Estudi comparatiu del nombre de dosis seminals	138
9.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	138
9.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	139
9.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	139
9.4. Comparacions entre grups	141
10. Estudi comparatiu del contingut de proteïna total	141
10.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	141
10.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	141
10.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	142
10.4. Comparacions entre grups	142
11. Identificació de les proteïnes amb residus fosforil·lats de tirosina ..	143
12. Estudi comparatiu del contingut de fructosa, glucosa i sorbitol	145
12.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	145
12.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	146
12.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	146
12.4. Comparacions entre grups	146

13. Estudi comparatiu de la fertilitat i la prolificitat	149
13.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial	149
13.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial	149
13.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial	149
13.4. Comparacions entre grups	150
DISCUSSIÓ	155
<u>CONCLUSIONS</u>	167
- De la qualitat espermàtica de l'ejaculat de mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor	167
- De la qualitat del semen i fertilitat de mascles exposats a condicions experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial ..	168
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	171

Introducció

INTRODUCCIÓ

1. OBJECTIUS DEL TREBALL I ORGANITZACIÓ DE LA MEMÒRIA

1.1. Objectius del treball experimental

Aquest treball de recerca s'integra en la línia d'investigació de la Unitat de Reproducció Assistida en Porcí de la Universitat de Girona, que des de l'any 1987 s'ha centrat en l'estudi de la biologia de la reproducció del mascle porcí i, molt especialment, en les alteracions produïdes en la qualitat espermàtica de l'ejaculat de mascles sotmesos a variacions en el ritme d'extraccions de semen, en la descripció estructural i ultraestructural de la morfologia dels espermatozoides madurs, immadurs i aberrants, en l'estudi estructural i ultraestructural del conducte epididimari i de l'esperma epididimària en les regions cefàlica, corporal i caudal, i en l'estudi de les alteracions en la qualitat espermàtica dels ejaculats i en l'estructura i ultraestructura testiculars provocades per la criptorquídia unilateral i bilateral.

Seguint aquesta línia, el present estudi es planteja analitzar els efectes del fotoperíode sobre la qualitat espermàtica i la fertilitat i prolificitat de mascles reproductors porcins mantinguts en unes condicions estandaritzades a fi

d'obtenir resultats fiables i estadísticament comparables. D'aquesta manera es podrà determinar quin és el fotoperíode amb el qual s'obté el màxim rendiment reproductiu dels mascles porcins i minimitzar, així, l'efecte negatiu que tenen els mesos d'estiu sobre l'eficiència reproductiva. Tanmateix, els resultats d'aquest treball contribuiran a estabilitzar el rendiment reproductiu del mascle porcí al llarg de tot l'any i, per tant, a incrementar el rendiment econòmic de les explotacions porcines.

En un àmbit més concret els objectius del present estudi són:

1. La caracterització dels efectes de les estacions de primavera i tardor sobre la qualitat microscòpica del semen dels mascles reproductors porcins postpuberals de raça pura, valorada mitjançant l'anàlisi dels paràmetres següents: el volum i pH dels ejaculats, la concentració, vitalitat i motilitat espermàtiques, la resistència osmòtica dels acrosomes i la morfologia espermàtica.
2. La determinació dels efectes dels fotoperíodes experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial sobre la qualitat microscòpica i bioquímica del semen dels mascles reproductors porcins postpuberals de raça pura, valorada mitjançant l'anàlisi dels paràmetres següents: el volum i pH dels ejaculats, la concentració, vitalitat i motilitat espermàtiques, la resistència osmòtica dels acrosomes, la morfologia espermàtica, el contingut de sucres i proteïnes del plasma seminal, i l'índex de fertilitat i prolificitat.
3. La determinació del temps de resposta dels mascles reproductors porcins postpuberals de raça pura, pel que fa a les variacions de la qualitat del semen, en cadascun dels fotoperíodes experimentals estudiats.
4. La determinació del fotoperíode experimental en el qual s'obté un major rendiment reproductiu dels mascles reproductors porcins postpuberals de raça pura.

1.2. Organització de la memòria

La memòria s'ha estructurat en els següents apartats: Introducció, Material i Mètodes, Resultats, Discussió, Conclusions i Bibliografia; els resultats obtinguts, així com la seva discussió, han estat agrupats en dos capítols.

En la INTRODUCCIÓ es descriuen, a partir d'una revisió bibliogràfica exhaustiva, els aspectes relacionats amb el fotoperíode del mascle porcí, la fisiologia reproductiva, les característiques de l'ejaculat, els factors que afecten la producció d'espermatozoides, i els marcadors de la qualitat microscòpica i bioquímica de l'ejaculat. Seguidament es fa una revisió de l'efecte del fotoperíode sobre la funció reproductora del mascle porcí, fent esment de l'estat actual de les investigacions, la gran controvèrsia existent pel que fa als resultats obtinguts i el grau d'innovació del present estudi. Finalment es tracta, molt breument, l'organització del sector porcí i la seva importància en l'àmbit alimentari.

En el MATERIAL I MÈTODES es descriuen les característiques dels exemplars estudiats i de la nau experimental, així com les tècniques d'obtenció i processament de les mostres d'esperma per a microscòpia òptica, d'anàlisi bioquímica del plasma seminal, i de valoració de la fertilitat i prolificitat del semen. La redacció dels protocols de preparació de mostres s'ha fet d'acord amb l'establert per Coromina i col. (2000) i Rigo i Genescà (2000) sobre els aspectes formals d'elaboració de la memòria de tesis doctorals i treballs de recerca.

El primer capítol, QUALITAT ESPERMÀTICA DE L'EJACULAT DE MASCLES EXPOSATS A CONDICIONS AMBIENTALS DE PRIMAVERA I TARDOR, consta de dos apartats: Resultats i Discussió. En els Resultats s'exposen els valors obtinguts de l'estudi comparatiu del volum i pH seminals, la concentració, motilitat i vitalitat espermàtiques, la resistència osmòtica dels acrosomes i la morfologia espermàtica dels ejaculats procedents de mascles porcins sans mantinguts en fotoperíodes estacionals de primavera i tardor, i s'estableix el

grau de significació de les diferències observades. En la Discussió es comparen i relacionen els resultats obtinguts amb les dades aportades per altres autors en estudis realitzats en mascles porcins i altres espècies de mamífers confinats a condicions estacionals.

El segon capítol, QUALITAT ESPERMÀTICA DEL SEMEN I FERTILITAT DE MASCLES EXPOSATS A DIFERENTS FOTOPERÍODES EXPERIMENTALS, s'estructura també en dos apartats: Resultats i Discussió. En els Resultats s'exposen els valors obtinguts de l'estudi comparatiu del volum i pH seminals, la concentració, motilitat i vitalitat espermàtiques, la resistència osmòtica dels acrosomes, la morfologia espermàtica, l'anàlisi bioquímica del plasma seminal i els índexs de fertilitat i prolificitat dels ejaculats de mascles porcins sans exposats al llarg de tres mesos a 24, 12 i 0 hores de llum artificial, i s'estableix el grau de significació de les diferències observades. En l'apartat de la Discussió es comparen i relacionen els resultats obtinguts amb les dades aportades per altres autors en estudis realitzats en mascles porcins i altres mamífers sotmesos a diferents fotoperíodes experimentals o naturals.

En les CONCLUSIONS es recullen les dades més rellevants de l'estudi i en la BIBLIOGRAFIA es citen aquelles obres més significatives consultades en l'elaboració del treball experimental.

2. EL MASCLE PORCÍ: FISIOLOGIA REPRODUCTIVA I CARACTERÍSTIQUES DE L'EJACULAT

El porc domèstic (*Sus domesticus*) (Figura 1) té actualment una gran importància en l'economia mundial. Dins el context d'una explotació porcina, el rendiment reproductiu del mascle porcí és un dels factors clau del desenvolupament econòmic, i per això és important evitar al màxim les situacions estressants i determinar quines són les condicions més idònies d'allotjament.

Pel que fa a les races, les més utilitzades en les explotacions porcínes de multiplicació de l'Europa Occidental i, més concretament, de Catalunya són Landrace, Piétrain i Duroc. La raça Landrace és originària de Dinamarca i prové de l'encreuament del porc nadiu amb la raça Large White; posteriorment, i a través d'exportacions regulars, els sementals danesos han contribuït de forma decisiva a formar les altres varietats de Landrace actuals com poden ser la sueca, l'anglesa, la belga, la francesa, l'alemanya i la noruega. Aquestes varietats responen als encreuaments que cada país ha anat fent per tal d'adaptar les característiques generals d'aquest animal a les seves necessitats específiques (Buxadé, 1984; Gordon, 1998). Els trets més significatius de la raça Landrace són: una gran longitud corporal, un desenvolupament muscular òptim, una gran aptitud maternal i, per tant, una elevada capacitat lletera; d'altra banda, presenta una gran sensibilitat a les situacions estressants i un caràcter força irascible.



Figura 1. El mascle reproductor porcí *Sus domesticus*, raça Landrace varietat anglesa.

2.1. Aspectes relacionats amb la regulació de la funció reproductora

2.1.1. Les estructures endocrines i les seves funcions

La funció reproductora del mascle porcí està regulada per les estructures endocrines següents: l'hipotàlem, l'hipòfisi o glàndula pituitària, el testicle (cèl·lules de Sertoli i cèl·lules de Leydig) i la glàndula pineal o cos pineal o epifisi cerebrí (Figura 2). L'hipotàlem elabora l'hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH), la qual estimula la secreció adenohipofisiària de l'hormona luteinizant (LH) i l'hormona fol·liculoestimulant (FSH) (Hughes i Varley, 1984; Combarrous, 1993; Haisenleder i col., 1994; Andersson, 1998; Andersen i col., 2001). L'LH actua sobre les cèl·lules de Leydig estimulants la secreció de testosterona, mentre que l'FSH estimula en les cèl·lules de Sertoli la conversió de testosterona en estrògens i la secreció de la proteïna fixadora d'andrògens (ABP) (Hughes i Varley, 1984; Dadoune i Demoulin, 1993; Setchell i col., 1994). Els estrògens produïts per les cèl·lules de Sertoli actuen sobre l'hipòfisi inhibint la secreció d'LH i FSH, sobre les cèl·lules de Leydig inhibint la secreció de testosterona, i sobre les cèl·lules epididimàries modulant la seva activitat secretora (Hughes i Varley, 1984; Wiseman i col., 1998; Goldman, 2001). L'associació ABP-testosterona estimula la meiosi dels espermatòcits primaris i, en conseqüència, incrementa l'activitat espermatogènica del testicle (Hughes i Varley, 1984; Dadoune i Demoulin, 1993; de Kretser i Kerr, 1994). En resposta a aquest augment de l'espermatogènesi, les cèl·lules de Sertoli sintetitzen i secreten inhibina, que actua en l'hipòfisi disminuint la secreció d'FSH. Els nivells plasmàtics de testosterona també regulen la secreció d'LH mitjançant un circuit de "feedback" negatiu, estimulen la libido i mantenen els caràcters sexuals secundaris, i modulen el creixement muscular i la distribució subcutània del greix (Hughes i Varley, 1984; Dadoune i Demoulin, 1993; Setchell i col., 1994) (Figura 3).

La glàndula pineal és un petit cos que es projecta dorsalment sobre el tronc de l'encèfal i que es desenvolupa a partir d'una invaginació del sostre del tercer ventricle diencefàlic (Figura 2a) (Bardasano, 1979; Austin i Short, 1984; Dadoune i Demoulin, 1993; Dyce i col., 1999). Està constituïda per una xarxa de trabècules conjuntives molt vascularitzades i amb abundants cèl·lules gials, some neuronals, fibroblasts i pinealòcits (Hadley, 1997). Els pinealòcits reben impulsos a través de les neurones simpàtiques postganglionars, les quals estan connectades al nervi òptic, que és estimulat per la llum que arriba a la retina. Els pinealòcits sintetitzen l'hormona N-acetil-5-metoxi-triptamina (melatonina) a través d'una via metabòlica complexa en la que hi intervenen diferents enzims, com l'hidroxi-indol-orto-metil transferasa (HIOMT) (Figura 4), que són funcionalment depenents dels nivells intracel·lulars d'AMPc (Hadley, 1996; Ribelayga i col., 2000; Stefulj, 2001). Els nivells d'AMPc depenen del grau de saturació dels receptors β -adrenèrgics dels pinealòcits, els quals interaccionen amb el neurotransmissor noradrenalina (NA), que és dependent de la llum (Hadley, 1996). La melatonina circulant és ràpidament metabolitzada pel fetge i eliminada per l'orina en forma d'un 6-hidroxiconjugat (Bardasano, 1979; Austin i Short, 1984; Hugues i Varley, 1984; Dadoune i Demoulin, 1993; Ribelayga i col., 2000). Aquesta hormona indolamina és present al plasma sanguini i a l'orina de molts mamífers, fins i tot de l'home (Aleandri i col., 1996).

La glàndula pineal forma part, per tant, del sistema fotoneuroendocrí. En el curs de la fil·logènia aquesta glàndula ha passat d'ésser un òrgan predominantment fotoreceptor, en vertebrats inferiors, a ésser una glàndula neuroendocrina que depèn de la informació fotònica captada per les cèl·lules sensibles de la retina (cèl·lules ganglionars) (Bardasano, 1979; Hugues i Varley, 1984; Hadley, 1996). Així doncs, la glàndula pineal té principalment dues funcions: a) la síntesi de l'hormona melatonina a partir del precursor aminoacídic triptòfan (Figura 4) i b) la transducció dels senyals fotoperiòdics cap a l'eix hipotàlemhipofisari (Figura 3) o bé directament cap als testicles (Aleandri i col., 1996).

La llum percebuda per la retina regula l'activitat dels nervis simpàtics que arriben a la glàndula pineal (Wurtman, 1967; Kumar i Rani, 1999). Aquests nervis, llavors, alliberen la NA que estimula la síntesi de l'enzim HIOMT en la glàndula pineal. La síntesi de melatonina, però, es produeix només durant les fases de foscor, ja que la llum inhibeix o deprimeix ràpidament l'activitat dels enzims pineals (Ebling i Hastings, 1992; Hadley, 1996; Arendt, 1997; Goldman, 1999, 2001). L'estimulació postganglionar dels pinealòcits depèn, per tant, de l'absència d'estimulació lluminosa a les retines oculars (Hadley, 1997). Existeix, doncs, un efecte de la durada del dia sobre la síntesi i secreció de melatonina; la glàndula pineal juga un paper important en el control de la funció reproductora actuant com un intermediari entre el fotoperíode extern i el medi intern, i essent el lloc físic on la informació lluminosa es transdueix en un missatger químic que és la melatonina (Axelrod i Chu, 1963; Wurtman, 1967; Hugues i Varley, 1984; Hadley, 1996; Partonen, 1999; Garcia-Allegue i col., 2001; Kennaway i col., 2002). La glàndula pineal pot ser considerada com un "tercer ull" i la melatonina com l'expressió química de la foscor (Bardasano, 1979; Aleandri, 1996; Hadley, 1996; Arendt, 1998). Encara que es coneix des de fa molt temps que aquesta glàndula juga un paper important en la regulació de la reproducció estacional, inhibint el desenvolupament i comportament sexuals (Wurtman, 1967; Bardasano, 1979; Arendt, 1999; Goldman, 1999), no se sap amb exactitud quin és el seu mecanisme d'acció concret. Es creu que la seva actuació depèn del model reproductiu de l'espècie en qüestió: en les espècies reproductores estacionals de dia llarg la melatonina té una acció antigonadotròpica inhibint la secreció d'LH i FSH i, per tant, disminuint la seva funció reproductora (Setchell i col., 1994; Wiseman i col., 1998), mentre que en les espècies reproductores estacionals de dia curt la melatonina podria activar la secreció d'LH i FSH i, per tant, la seva funció reproductora s'estimularia (Karsh i col., 1994; Aleandri, 1996). Aquesta acció estimuladora de la melatonina sobre l'eix hipotàlemhipofisari podria ser deguda

a un desequilibri en els nivells de FSH i LH generat per un hiperestimulació de la GnRH en fotofases llargues (Whittemore, 1988).

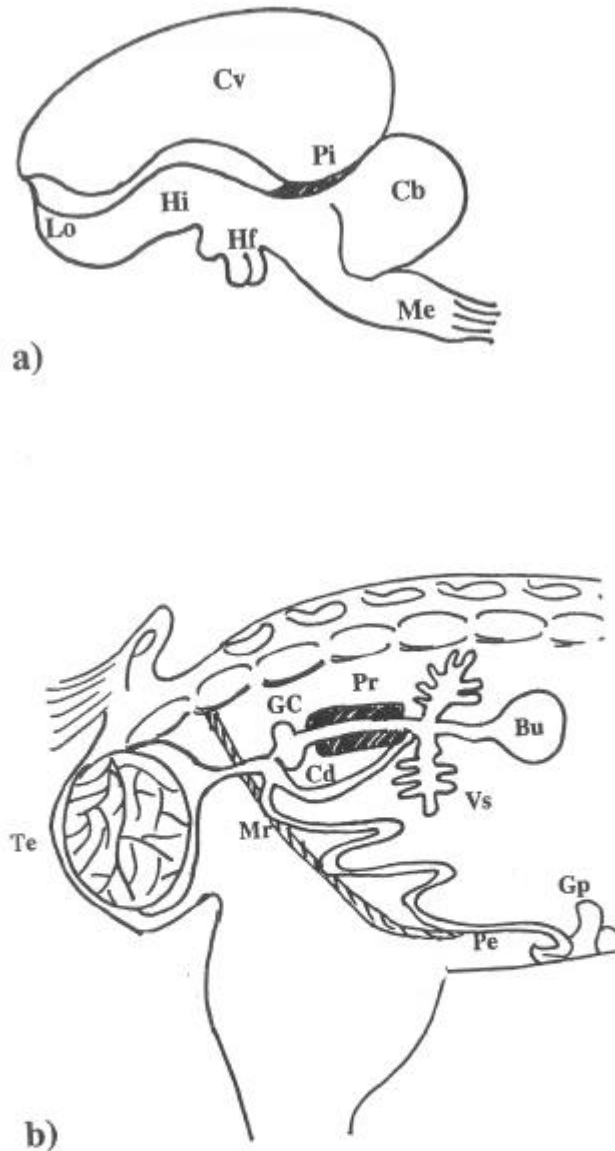


Figura 2. a) Visió lateral de l'encèfal de porcí on es localitzen les regions implicades en la regulació endocrina de la funció reproductora: cerebel (Cb), cervell (Cv), glàndula pineal (Pi); hipòfisi (Hf), hipotàlem (Hi), lòbul olfatori (Lo) i medul·la espinal (Me) (modificat de Hugues i Varley, 1984), i b) aparell genital del mascle porcí: bufeta urinària (Bu), conducte deferent (Cd), glàndules de Cowper (GC), glàndula prepucial (Gp), epidídim (Ep), (modificat de Ashdown i Hancock, 1974; Martín, 1982; McDonald, 1991).

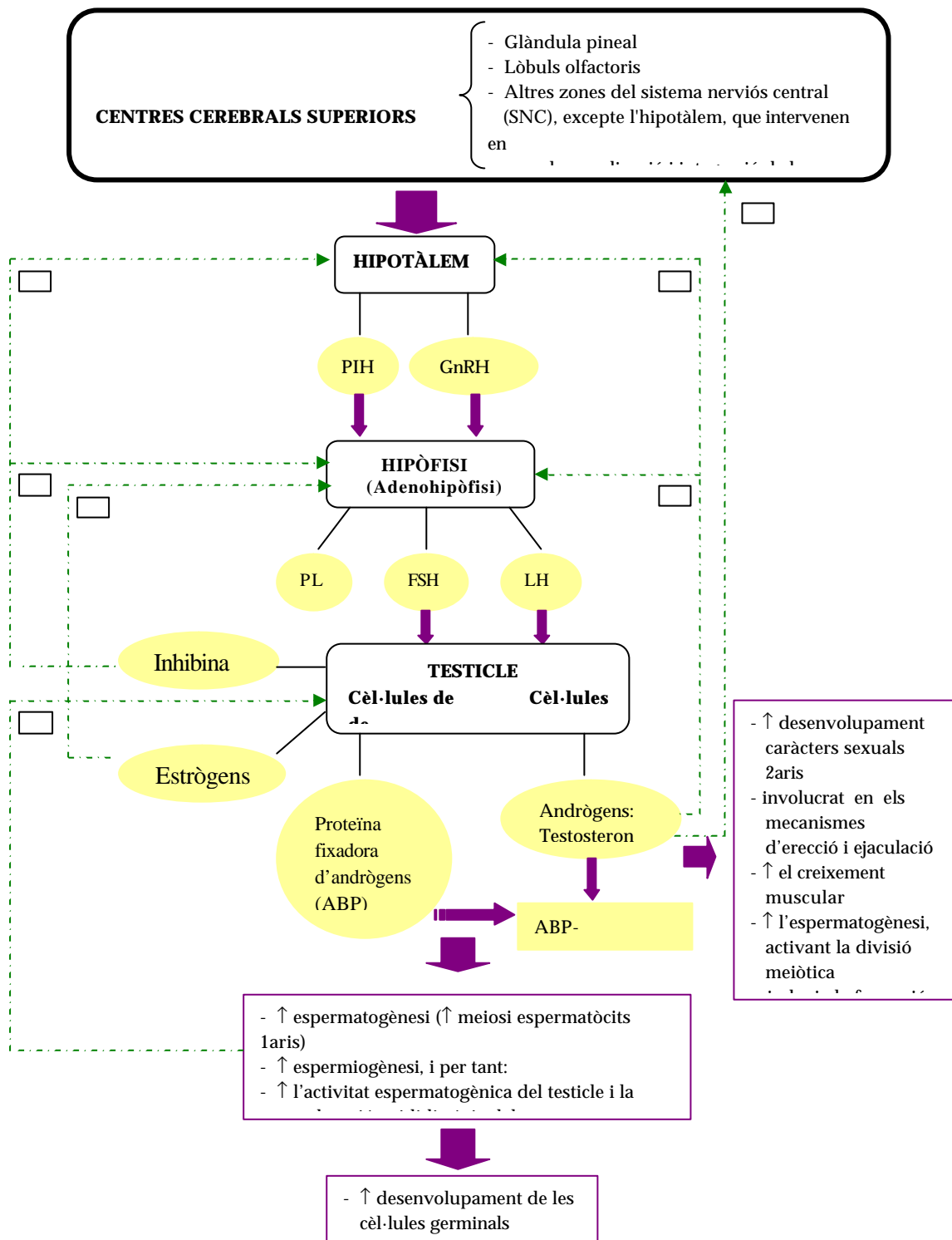


Figura 3. Esquema dels circuits tissulars, hormonal i de retrofuncionalitat que intervenen en la funció reproductora del mascle porcí. PL: prolactina, PIH: hormona inhibidora de prolactina (modificat de Hugues i Varley, 1984; Dadoune i Demoulin, 1993; Setchell i col., 1994).

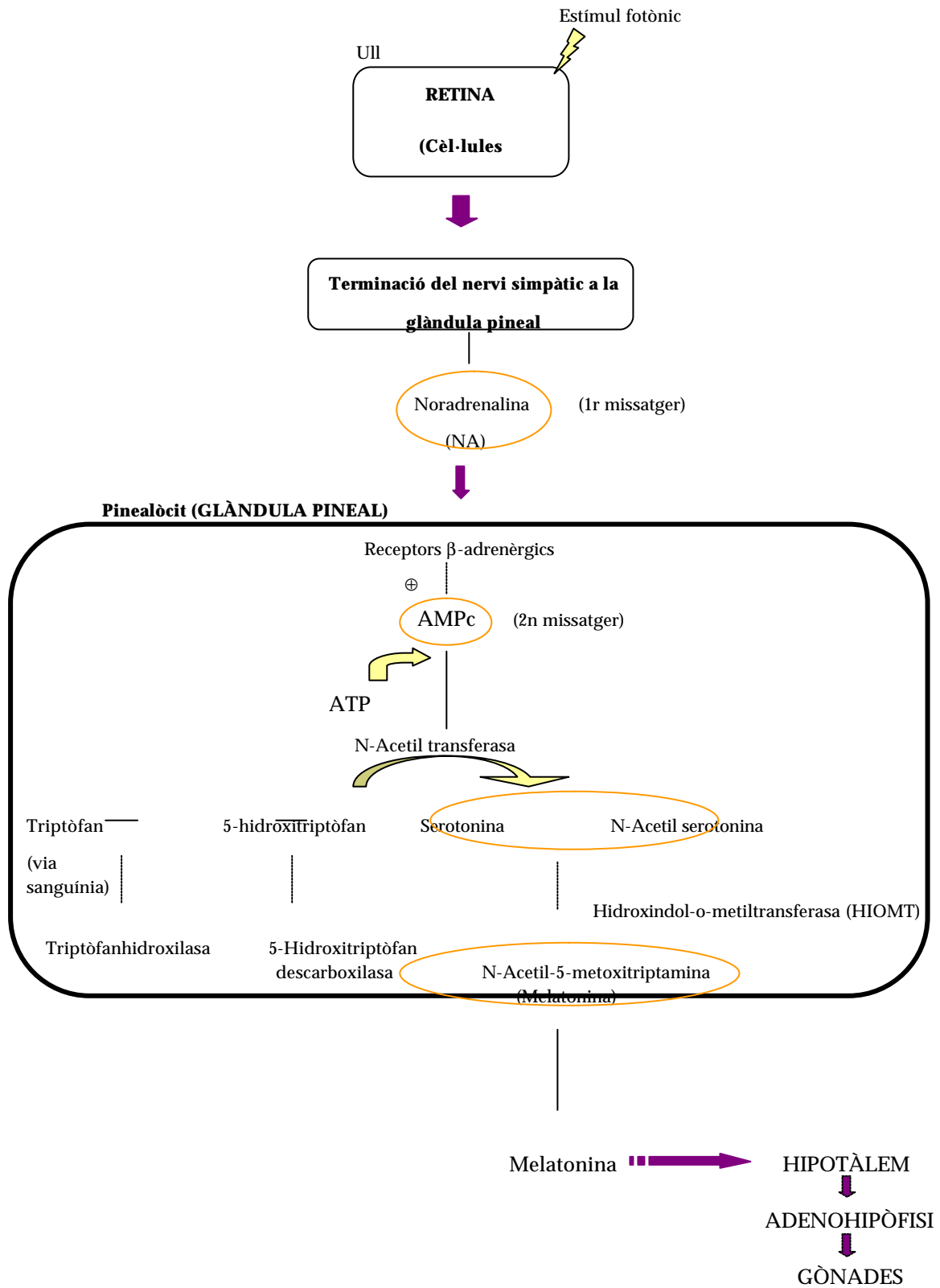


Figura 4. Via metabòlica de síntesi de melatonina integrada en la informació procedent de l'ambient i en lacció sobre l'eix hipotàlemhipofisari-hipotalàmic (modificat de Hadley, 1996; Arendt, 1998).

2.1.2. El ritme circadià de llum-fosc

L'existència d'un ritme fisiològic diari de 24 hores de llum-fosc s'ha posat de manifest des de fa molt temps en nombrosos estudis realitzats en moltes espècies animals (Short, 1973; Bardasano, 1979; Austin i Short, 1984; Martinet i Mondain-Monval, 1993; Gorman i col., 2001; Abe i col., 2002). Aquest ritme circadià, de naturalesa endògena, controla moltes de les funcions fisiològiques i de comportament de les espècies, i té un efecte molt important sobre la funció reproductora (Arendt, 1998; Andersen, 2001; Horton i col., 2001; Abe, 2002).

La majoria d'organismes vius estan subjectes a un ritme ambiental (sobretot de llum i temperatura, encara que poden haver-hi altres indicadors temporals) que ajusta i regula aquest ritme circadià endogen (Alila-Johansson i col., 2001). Aquest ajustament serveix per a sincronitzar els ritmes biològics, que no arriben a ser de 24 hores, amb el ritme diari precís imposat per l'ambient. Els rellotges biològics se sincronitzen o s'ajusten mitjançant estímuls ambientals que són, a la vegada, periòdicament recurrents (Martinet i Mondain-Monval, 1993; Hadley, 1996; Guerin i col., 2000; Abe i col., 2002; Bestaali i col., 2002).

La rotació diària de 24 hores de la Terra sobre el seu propi eix, els 365 dies que tarda la Terra en descriure la seva òrbita al voltant del Sol i els 28 dies de rotació de la Lluna sobre la Terra indueixen, indubtablement, canvis en factors geofísics i biòtics. Així doncs, l'organisme experimenta canvis metabòlics lligats a les variacions ambientals (Hadley, 1996; Arendt, 1998; Andersen i col., 2001). Concretament el ritme circadià de llum-fosc és el que estimula la síntesi i secreció de melatonina en els pinealòcits, assolint els nivells plasmàtics més alts en els períodes de fosc (Figura 5). La melatonina plasmàtica actua sobre les neurones monoaminèrgiques properes a l'hipotàlem estimulants la secreció de

catecolamines i/o pèptids opioïdes, els quals regulen la secreció pulsàtil hipotalàmica de GnRH que, a la vegada, estimula en l'hipòfisi la secreció d'FSH, LH i prolactina (PL) (Bardasano, 1979; Austin i Short, 1984; Goldman, 1999; Garcia-Allegue i col., 2001).

La glàndula pineal juga, per tant, un paper important en el control de la reproducció en mamífers mitjançant la seva acció sobre l'eix hipotàlemhipofisari i sobre la funció testicular. Els seus efectes influeixen també en l'inici de la pubertat i en la reproducció estacional (Andersson i col., 1997, 1998; Böllinger i col., 1997; Goldman, 1999, 2001).

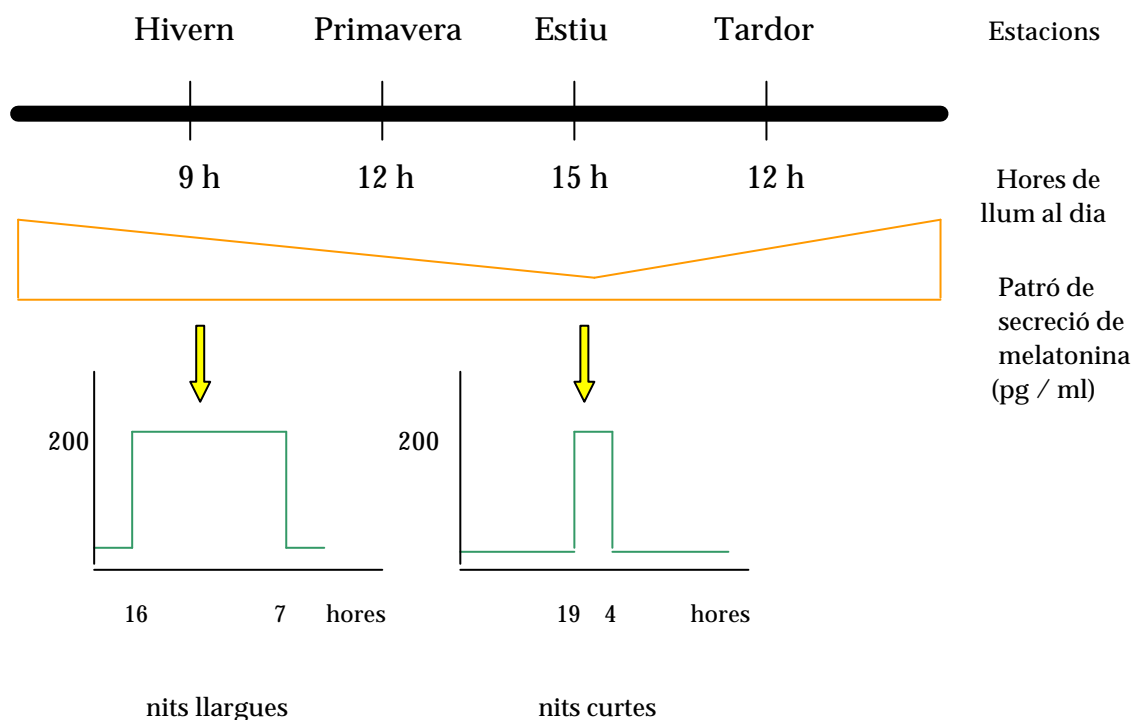


Figura 5. Patró de secreció de la melatonina segons les estacions i les hores de llum (modificat de Chemineau i col., 1993).

2.1.3. La reproducció estacional

La majoria dels mamífers presenten cicles reproductius caracteritzats per una fase d'activitat sexual, normalment restringida a un període curt de l'any (estació d'estre), seguida d'una fase de repòs sexual (estació d'anestre) conseqüència d'una regressió de l'activitat gonadal i, fins i tot, d'una involució de les estructures reproductives (Chemineau i col., 1991; Bronson i Heideman, 1994; Arendt, 1998; Chacón i col., 2002; Larkin i col., 2002). La reproducció estacional de les espècies animals representa, doncs, una adaptació evolutiva per fer coincidir el període de neixements amb l'època de l'any més favorable per al desenvolupament de les cries (disponibilitat d'aliments, factors climàtics, etc). Així, en les espècies amb reproducció estacional l'època d'aparellament i el fet que aquesta es doni en les millors condicions com per a garantir l'èxit reproductiu (màxima libido d'ambdós sexes, bona capacitat fecundant del semen, presència de zel i ovulació de la femella) són dos aspectes controlats per l'activitat de la glàndula pineal, a partir de la informació que obté del fotoperíode ambiental (McDonald, 1991).

Als hemisferis nord i sud l'efecte de les estacions creix en latitud mentre que a l'equador aquest efecte és menys apreciable (Ortavant i col., 1964; Short, 1973; Dawson, 1998; Levine, 1999; Chacón i col., 2002). En períodes llargs de foscor (dies curts i nits llargues, per exemple en els mesos d'hivern a l'hemisferi nord) hi ha més producció de melatonina i la seva secreció perdura més que en els períodes curts de foscor (dies llargs i nits curtes, per exemple els mesos d'estiu a l'hemisferi nord) (Ebling i Hastings, 1992; Arendt, 1998). Depenent de l'època de cria es distingeix entre espècies de desenvolupament de dia curt i espècies de desenvolupament de dia llarg; ambdues modalitats fan servir el mateix senyal, la melatonina, per tal de reconèixer els canvis en la longitud de la fotofase, encara que la seva interpretació fisiològica pugui ser diferent (Chemineau i col., 1991; Karsh i col., 1994; Aleandri i col., 1996; Arendt, 1998; El-Alamy i col., 2001).

2.1.4. L'ancestre del porc domèstic (*Sus domesticus*): el porc salvatge (*Sus scrofa*)

El porc domèstic (*Sus domesticus*) ha estat tradicionalment considerat com una espècie amb cicles poliestrals i capaç de reproduir-se al llarg de tot l'any; tot i així s'ha demostrat que, pel que fa a la seva eficiència reproductiva, conserva una certa influència estacional del seu ancestre el porc salvatge o porc senglar (*Sus scrofa*) (Figura 6), que és considerat un reproductor de dia curt (Mauget, 1982; Claus i Weiler, 1985; Chemineau i col., 1991; Love i col., 1993; Prunier i col., 1994; Dial i col., 1997; Dawson i Peters, 1998; Tast i col., 2001). En el porc salvatge, els mascles presenten un pes testicular més gran a la tardor i hivern, i els nivells màxims de testosterona plasmàtica entre els mesos de desembre i març; a les femelles la inactivació de l'ovari té lloc a l'estiu, i els nivells plasmàtics de progesterona i estradiol són mínims a l'estiu i tardor (Mauget, 1982, 1987).

De fet la majoria dels animals domèstics, prèviament a la seva domesticació, tenien períodes de cria diferents dels actuals i en concordança amb els que presenten avui dia els seus ancestres salvatges (Nalbandov, 1969). La domesticació ha emmascarat aquestes estratègies adaptatives al medi ambient favorable, minimitzant així els efectes climàtics adversos, per bé que no les ha eliminat del tot, observant-se en molts casos variacions reproductives al llarg de l'any (Mauget, 1987; Skinner i col., 1999; Tast i col., 2001).

El mascle porcí, encara que és sexualment actiu al llarg de tot l'any, presenta una qualitat seminal màxima en els períodes de dia curt i nit llarga. Així doncs, la independència estacional de la reproducció no ha desaparegut completament en el porc domèstic, persistint una disminució de la fertilitat en el període estival. Les variacions anuals en l'eficiència reproductora del porc domèstic tenen conseqüències econòmiques negatives a les explotacions porcines (Wiseman i col., 1998).



Figura 6. El porc senglar o porc salvatge *Sus scrofa*.

2.2. L'espermatogènesi i la maduració epididimària

L'espermatogènesi, d'uns 30 dies de durada a l'espècie porcina, es divideix en tres etapes: 1) l'espermatocitogènesi, 2) la meiosi i 3) l'espermiogènesi (Esponda, 1985; de Kretser i Kerr, 1994; Hetch, 2000).

Al llarg de l'espermatocitogènesi, les espermatogònies mare o primordials, que són cèl·lules diploides, a través de successives divisions mitòtiques originen els espermatòcits, els quals tenen també una dotació diploide (de Rooij i col., 2000). Els espermatòcits són les cèl·lules implicades en el procés de la meiosi. La meiosi requereix de dues divisions cel·lulars designades com a meiosi I i meiosi II; en cadascuna d'aquestes divisions hi intervenen, respectivament, els espermatòcits primaris i els espermatòcits secundaris (Pinart i col., 1999a, 2000). Les espermatides joves, amb una dotació haploide de cromosomes, es formen com a resultat de la divisió dels espermatòcits secundaris (Esponda, 1985; Dadoune i Demoulin, 1993; de Kretser i Kerr, 1994). L'espermiogènesi es divideix en quatre fases: la fase Golgi, la fase de caputxó, la fase acrosòmica i la

fase de maduració (de Kretser i Kerr, 1994; Robaire, 1999). Al llarg d'aquestes fases es produeixen canvis morfofuncionals complexes en les espermatides que donen lloc a la formació d'espermatozoides: 1) desenvolupament de l'acrosoma, 2) desenvolupament del flagel, 3) elongació del nucli i condensació de la cromatina i 4) reorganització del citoplasma i els orgànuls cel·lulars (Pinart i col., 2000, 2001). Un cop formats, els espermatozoides testiculars són alliberats a la llum dels conductes seminífers mitjançant el procés d'espermiació (Robaire, 1999).

La maduració epididimària dels espermatozoides és necessària per tal que aquests adquireixin l'aptitud fecundant i la motilitat (Sullivan, 1999; Calvo i col., 2000). Al llarg de la maduració epididimària, que dura per terme mig uns quinze dies en porcí, es produeixen canvis funcionals en el nucli, l'acrosoma i el flagel (Briz i col., 1996; Sullivan, 1999; Calvo i col., 2000).

Les etapes del cicle de l'epiteli seminífer canvien en funció del temps i també en funció del recorregut (Setchell, 1991). Així doncs, podem definir l'*ona espermatoogènica* com el canvi seqüencial en l'estadi del cicle espermatoogènic al llarg del túbul seminífer i l'*ona epididimària* com el canvi seqüencial en la maduració epididimària al llarg del conducte epididimari (Fournier-Delpech i Thibault, 1993).

2.3. L'ejaculat

En porcí les primeres ejaculacions es presenten entre els 5-6 mesos d'edat, coincidint amb l'inici de la pubertat. No obstant, en alguns casos pot haver-hi maduresa sexual tardana als 8-9 mesos d'edat. Dels 8 als 12 mesos els mascles són considerats postpuberals i a partir d'aquesta edat es consideren ja completament madurs o adults (Martín, 1982; Hugues i Varley, 1984).

El volum de semen ejaculat a l'espècie porcina varia entre 200-250 ml segons Martín (1982), entre 150-300 ml segons Garner i Hafez, (1986) i entre 200-300 ml

segons Rothschild (1998) i Pinart i col. (1999b); de totes maneres aquest paràmetre està sotmès a importants variacions tant degudes a l'efecte individu com a l'efecte ambient (Setchell, 1991). El volum de semen ejaculat en porcíns és considerablement elevat si es compara amb el d'altres espècies d'animals domèstics. Així, en cavalls el volum d'ejaculat varia entre 30 i 150 ml (Rasbech, 1984; Bonadonna, 1989); en toros s'han descrit valors d'entre 5 i 8 ml (Garner i Hafez, 1986), entre 2 i 10 ml (Rasbech, 1984) i entre 20 i 30 ml (Setchell, 1991); en bocs el volum de l'ejaculat oscil·la entre 0,2 i 2,5 ml (Garner, 1991; Setchell, 1991); en bous els valors varien segons els autors entre 0,8 i 3 ml (Rasbech, 1984) i entre 0,8 i 1,2 (Garner i Hafez, 1986). En humans els valors normals de referència varien entre 1,5 i 5,5 ml (Keel, 1990), entre 2 i 6 ml (Ludwig i Frick, 1990), entre 2,5 i 8 ml (Taymor, 1990) i més de 2 ml (Andolz i Bielsa, 1995; OMS, 1999; WHO, 2000).

A l'ejaculat del mascle porcí es poden distingir clarament tres fraccions, resultat de les secrecions procedents de les diferents glàndules sexuals accessòries així com de l'activitat testicular i epididimària (Pond, 1976; Pond i Houpt, 1981; Martín, 1982; Buxadé, 1984; Fournier-Delpech i Thibault, 1993; Garner i Hafez, 1996):

- *Fracció preespermàtica*: formada per les secrecions de la pròstata, les vesícules seminals i les glàndules de Cowper o bulbouretrals. Té un volum aproximat de 10 ml, és gairebé transparent i no conté pràcticament espermatozoides, sinó que presenta grumolls de textura gelatinosa procedents de les glàndules de Cowper que reben el nom de "tapioca". Sol presentar, a més, una important contaminació bacteriana.
- *Fracció espermàtica (o rica en espermatozoides)*: té un volum aproximat de 70 ml, un color blanquinós i aspecte lletós, i presenta una concentració elevada d'espermatozoides procedents de l'activitat dels testicles (de $0,5 \times 10^9$ a 1×10^9 espermatozoides/ml). Conté, a més, secrecions de les vesícules seminals i de la pròstata.

Components	Valors extrems
pH (unitats de pH)	7,3-7,8
Aigua (g/ml)	94-98
Sodi (mg/100 ml)	290-850
Potasi (mg/100 ml)	80-380
Calci (mg/100 ml)	2-6
Magnesi (mg/100 ml)	5-14
Clor (mg/100 ml)	260-430
Zenc (µg/100 ml)	8-78
Fructosa (mg/100 ml)	3-50
Fósfor total (mg/100 ml)	56-76
Nitrogen total (mg/100 ml)	335-765
Àcid Làctic (mg/100 ml)	25-35
Àcid Cítric (mg/100 ml)	30-330
Inositol (mg/100 ml)	380-630
Glicerofosforilcolina (mg/100 ml)	110-240
Ergotioneïna (mg/100 ml)	6-23

Taula 1. Components del semen porcí (White, 1958; Hugues i Varley, 1984; Fournier-Delpech i Thibault, 1993; Luke i Coffey, 1994; Setchell i col., 1994).

- *Fracció postesperemàtica (o pobra en espermatozoides):* constituïda per les secrecions de la pròstata i les glàndules de Cowper. Té un volum aproximat de 150 ml, és de color blanquinós gairebé transparent i conté pocs espermatozoides ($< 10^6$ espermatozoides/ml), però abundants grumolls gelatinosos procedents de les secrecions de la pròstata i les glàndules de Cowper.

Els percentatges en què intervenen les diverses glàndules genitals en la formació del semen del mascle porcí són els següents: el testicle i l'epidídim aporten el 2-5%, les vesícules seminals el 10-25%, les glàndules de Cowper el 15-30% i la pròstata el 50-70% (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Setchell, 1994; Luke i Coffey, 1994; Garner i Hafez, 1996). La composició bioquímica del plasma seminal es resumeix a la Taula 1.

2.4. L'espermatozoide

L'espermatozoide madur de *Sus domesticus* és un gàmeta de 45 µm de longitud en què es distingeixen tres parts: el cap, el coll o peça de connexió i la cua (Bonet i col., 2000). La cua està formada per tres peces: la intermèdia o mitocondrial, la principal i la terminal (Figura 7). El cap és oval i pla i les seves mides són 7 µm de longitud, 3,7 µm d'amplada màxima i 0,4 µm de gruix. Les dues cares no són iguals; mentre que una és plana, l'altra presenta una protuberància apical en forma de semilluna, d'uns 0,4 µm d'amplada, que s'estén pels marges del cap al llarg d'1,2 µm (Garner i Hafez, 1996; Bonet i col., 2000).

El coll, de 0,7 µm de longitud per 0,5 µm de gruix, té forma cònica amb la base més ampla (1,3 µm) en contacte amb el cap i la més estreta (0,6 µm) en contacte amb la peça intermèdia. En la zona més propera al cap es pot observar una protuberància anular de 0,15 µm de diàmetre (Bonet i col., 2000).

La cua té forma filamentosa i cilíndrica. La peça intermèdia té una longitud de 9 µm i un diàmetre de 0,7 µm. La peça principal té una longitud de 26,2 µm i un diàmetre de 0,4 µm i, finalment, la peça terminal té una longitud de 2,2 µm i un diàmetre de 0,2 µm (Briz, 1994; Bonet i col., 2000).

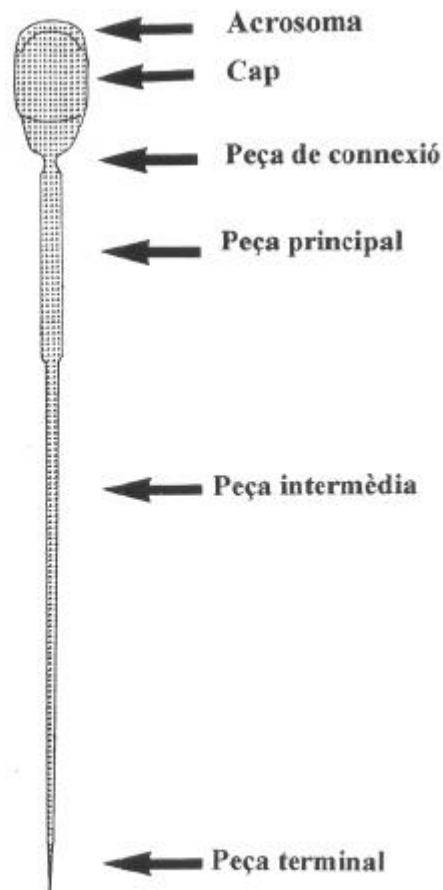


Figura 7. Dibuix de l'espermatozoide de *Sus domesticus* (Briz, 1994; Bonet i col., 2000).

2.5. Factors que afecten la funció reproductiva

Existeixen diferents factors que influeixen en la funció reproductora del bestiar porcí. Quan un factor altera la funció reproductora d'una femella, aquesta acostuma a entrar en anestre, inhibint-se l'ovulació (Claus i Weiler, 1985; Chemineau i col., 1999; Peltoniemi i col., 1999). Quan un factor altera la funció reproductora d'un mascle ho fa, normalment, alterant la libido o/i la qualitat i el poder fecundant del semen (Buxadé, 1984; Cameron, 1985; Chemineau i col., 1991; Love i col., 1993).

Entre els factors que influeixen en la funció reproductora del mascle porcí cal destacar la raça, l'edat, l'individu, el pes o la grandària dels testicles, la temperatura i la humitat ambiental, el fotoperíode, les estacions, el ritme

d'extraccions de semen, el règim alimentari, l'estat fisiològic, l'allotjament i la manipulació (Cameron, 1985; Martinet i Mondain-Monval, 1993; Briz i col., 1996; Skinner i col., 1999; Sancho i col., 1999; Ciereszko i col., 2000; Pinart i col., 1999a, 2001).

2.5.1. Factors fisiològics

a) La raça

La raça influeix entre altres factors en la grandària dels testicles i per tant també en la producció espermàtica (Buxadé, 1984; Ciereszko i col., 2000). En general, les races amb marcada aptitud maternal, com la Large-White o la Landrace, tenen uns testicles més grans que les races d'aptitud càrnica com la Blanc Belga o la Piétrain (Martín, 1982). Les races americanes Duroc i Hampshire són intermèdies. No obstant, les races pures i altament seleccionades són menys fèrtils que les races híbrides (Hugues i Varley, 1984).

b) L'edat

La producció espermàtica s'incrementa amb l'edat donat que augmenta la grandària dels testicles. La producció d'espermatozoides en el mascle porcí comença als 5-6 mesos d'edat (Martín, 1982; Hugues i Varley, 1984). No és, però, fins als 7-8 mesos d'edat (mascles postpuberals) que la producció espermàtica assoleix uns nivells normals (Buxadé, 1984). Estudis recents realitzats per Horton i Yellon (2001) suggereixen que amb l'edat disminueix la resposta de l'organisme enfront la melatonina.

c) L'individu

Dins d'una mateixa raça hi ha diferències individuals molt notòries. Existeixen línies o famílies que es caracteritzen per tenir una grandària testicular

significativament superior a la mitjana de la seva raça (Garner i Hafez, 1996). En principi, els mascles amb testicles més grans proporcionen major nombre de dosis seminals per unitat de temps (Ciereszko i col., 2000); de tota manera cal tenir present que la consanguinitat disminueix l'activitat testicular (Garner i Hafez, 1996). Hi ha factors genètics que també influeixen en la producció espermàtica; per exemple la presència de gens recessius que determinen anomalies espermàtiques greus poden, fins i tot, produir esterilitat (Buxadé, 1984).

d) La grandària dels testicles

Existeix una correlació positiva entre el pes testicular i el nombre de cèl·lules germinals i, per tant, el nombre d'espermatozoides produïts (de Kretser i Kerr, 1994; Kerr, 1995). Els principals factors que influeixen en la grandària dels testicles són: l'edat, la raça, l'individu i el ritme d'extraccions (Buxadé, 1984; Garner i Hafez, 1996; Ciereszko i col., 2000).

2.5.2. Factors ambientals

a) La temperatura i la humitat

Les temperatures elevades provoquen una reducció del rendiment reproductiu del mascle porcí degut a la seva dificultat per eliminar l'excés de calor corporal (Steinberger, 1991). Aquest problema, conegut des de fa temps, es designa com a "estrés tèrmic" (Pond, 1976; Martín, 1982; Love i col., 1993; Levine i col., 1999; Levis, 1999; Ciereszko i col., 2000; Alila-Johansson i col., 2001). Segons Buxadé (1984) i Fuentes i col. (1993) temperatures de 30-35°C no redueixen l'impuls sexual dels porcs, però alteren la qualitat del semen a conseqüència d'una disminució de la concentració i la motilitat espermàtiques, i d'un increment de la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en l'acrosoma. L'efecte de les

temperatures elevades sobre la qualitat del semen s'observa ja al cap de quinze dies d'exposició, i es manté fins a sis setmanes després d'haver desaparegut el factor (Christenson, 1973, 1981; Buxadé, 1984; Love i col., 1993). Aquest fet guarda relació amb el cicle espermatogènic i posterior maduració dels espermatozoides a l'epidídim; per exemple, tres dies d'estrés per calor poden debilitar la fertilitat del mascle durant un mes o, fins i tot, més (Martinet i Mondain-Monval, 1993). Aleandri (1996) va suggerir que l'efecte negatiu de les temperatures elevades es produeix més que per la temperatura en sí, per les seves oscil·lacions.

Les baixes temperatures no semblen tenir un efecte advers sobre la qualitat seminal, sinó que estimulen el creixement testicular dels mascles reproductors porcins joves (Swiestra, 1970; Martín, 1982; Martinet i Mondain-Monval, 1993).

Altres factors com la humitat i la ventilació també són importants a l'hora d'optimitzar el rendiment reproductiu del mascle porcí. L'increment de la temperatura ambiental pot comportar un augment de la temperatura corporal i, per tant, de la taxa respiratòria. L'ús de sistemes de ventilació en les naus de confinament és important per tal d'eliminar o bé reduir els gasos nocius, pols i olors desagradables (CO_2 , NH_3 , H_2S i CH_4 , entre d'altres) (Muehling, 1970; Le Dividich, 1996).

b) El fotoperíode

Aquest factor té un paper clau en la producció d'espermatozoides i és l'objectiu d'estudi del present treball. Segons Buxadé (1984) fotofases superiors a 16 hores de llum produeixen una disminució de la fertilitat del semen. El fotoperíode pot modificar la pauta de secreció hipotalàmica: l'exposició dels mascles a dies amb fotofases curtes fa disminuir la freqüència de secreció d'LH; aquesta alteració, però, no sembla estar relacionada amb anomalies en la secreció de GnRH (Martinet i Mondain-Monval, 1993). Estudis realitzats en ovelles, reproductors de dia curt, han demostrat que l'inici de l'anestre de la femella es manifesta

associat a un marcat canvi en la freqüència de secreció de GnRH. D'altra banda la transició, en aquesta espècie, d'un fotoperíode a un altre pot comportar canvis molt més pronunciats en l'activitat espermatogènica que l'exposició a diferents condicions de llum durant llarg períodes de temps (Ebling i Hastings, 1992; Kumar i Rani, 1999; Yellon i Tran, 2002).

En humans s'ha demostrat que hi ha una relació inversa entre la intensitat de llum i la concentració plasmàtica de melatonina al llarg de la fotofase (Aleandri i col., 1996; Hadley, 1996). Altres estudis realitzats en porcs han determinat que la intensitat crítica de lluminositat que indueix el ritme circadià de secreció de melatonina és d'uns 200-300 lux (Love i col., 1993); aquest és el motiu que en molts estudis sobre la influència del fotoperíode no s'hagi tingut en compte que règims de llum inferiors a 200 lux poden tenir el mateix efecte que les fases de foscor. D'altra banda, estudis portats a terme per Tast i col. (2001) han determinat que règims de llum superiors a 200 lux no milloren l'eficiència reproductiva del mascle porcí. L'efecte del fotoperíode pot estar, a més, relacionat amb altres factors com l'alimentació i la latitud (Levine, 1999; Chacón i col., 2002); Jensen i col. (1970) descriuen una millor utilització dels aliments en aquells mascles mantinguts en condicions de foscor durant llargs períodes de temps. A l'hemisferi nord els efectes del fotoperíode són més palesos a mesura que anem pujant de latitud ja que també augmenten els canvis estacionals; en canvi, a la zona equatorial el paper del fotoperíode està menys definit i són altres factors ambientals els que tenen major importància (Dawson i col., 1998).

En la majoria d'espècies la domesticació ha comportat la pèrdua de l'estacionalitat, no obstant, s'observen patrons de comportament associats als ancestres estacionals pel que fa a l'eficiència reproductiva en determinades èpoques de l'any (Mauget, 1982; Claus i Weiler, 1985; Tast i col., 2001). De totes maneres, el patró reproductiu del porc domèstic no està totalment definit; tot i que el fotoperíode i les elevades temperatures semblen ser els principals factors responsables del descens de la fertilitat estival, altres factors ambientals també

han de ser considerats a l'hora de buscar la màxima eficiència reproductiva en porcí.

c) Les estacions de l'any

L'estació de l'any està determinada pel fotoperíode i la temperatura. Al llarg de l'any la qualitat del semen del mascle porcí varia, essent màxima a finals de la tardor i durant l'hivern (temperatures baixes i dies amb poques hores de llum) i disminuint de forma significativa a l'estiu (temperatures altes i dies amb moltes hores de llum) (Mauget, 1982, 1987; Claus i Weiler, 1985; Chemineau i col., 1991; Love i col., 1993; Prunier i col., 1994; Dial i col., 1997; Ciereszko i col., 2000). L'efecte negatiu de les temperatures elevades es veu agreujat per períodes llargs de llum, en els que es produeix la degeneració de les cèl·lules germinals testiculars i l'alteració de la maduració epididimària dels espermatozoides (Buxadé, 1984; Claus i Weiler, 1985; Andersson i col., 1998; Andersen, 2001; Ben Saad i col., 2002).

La femella reproductora també veu afectada la seva eficiència reproductiva segons l'estació de l'any, essent menor a l'estiu (Aumaitre i col., 1976; Buxadé, 1984). Existeix, doncs, una sinèrgia entre els dos sexes que provoca una davallada del rendiment reproductiu i, per tant, de la fertilitat del bestiar porcí durant els mesos d'estiu (Martinet i Mondain-Monval, 1993).

2.5.3. Factors de confinament

a) El ritme d'extraccions de semen

Segons Hugues i Varley (1984) i Bonet i col. (1991) la freqüència de recollida del semen és un factor a tenir en compte. Durant l'ejaculació es produeix l'expulsió d'un 60% dels espermatozoides emmagatzemats a la cua de l'epidídim (Hugues i Varley, 1984; Tanaka i col., 2000). Així doncs, un nombre excessiu d'extraccions (més de 2 per setmana), sense períodes de repòs, resulta en l'esgotament de les

reserves epididimàries, i força el pas dels espermatozoides a través del conducte, manifestant-se en un descens de la concentració espermàtica i un increment del nombre d'espermatozoides immadurs a l'ejaculat (Bonet i col., 1991, 1993; Briz i col., 1995, 1996; Tanaka i col., 2000). Hugues i Varley (1994) aconsellen un nombre d'extraccions de semen de 4 a la setmana. Bonet i col. (1991, 1993), WHO (2000) i Kvist i Björndahl (2002), d'altra banda, afirmen que l'interval òptim de recollida de semen és de 3-4 dies.

El fet de distanciar les extraccions més d'una setmana també és perjudicial ja que provoca l'envelliment dels espermatozoides emmagatzemats a la cua de l'epidídim, i interfereix negativament en la conservació del semen (Buxadé, 1984; Bonet i col., 1991, 1993).

b) El règim alimentari

L'alimentació és un factor important que afecta l'eficiència reproductiva dels mascles. Phillips i Andrews (1936) ja apuntaven una reducció del diàmetre dels túbuls seminífers dels testicles com a conseqüència d'una disminució en la ingesta de l'animal. Segons Buxadé (1984) i Louis i col. (1994) la subalimentació retarda l'inici de la pubertat del mascle, disminueix la libido i la qualitat del semen i, si aquesta es produeix abans de l'arribada de la pubertat, provoca anomalies pràcticament irreversibles en el desenvolupament del sistema endocrí, que no poden ser compensades amb una sobrealimentació posterior.

D'altra banda, la sobrealimentació tampoc representa cap avantatge sinó que comporta un escurçament de la vida sexual de l'animal, una degeneració de l'epiteli seminífer i, per tant, l'alteració de l'espermatogènesi, una major dificultat en la munta i un descens de la libido (Colebrander i Kemp, 1990; Louis i col., 1994).

S'ha calculat que, per tal de subministrar al mascle una alimentació suficient, la ració diària ha de ser entre 2,5 i 3,5 Kg, depenent del tipus de pinso, l'estat fisiològic de l'animal, el ritme de cubricions i el tipus d'allotjament (Buxadé,

1984). Dins la ració cal tenir també en compte, per la seva influència en la producció d'espermatozoides, el contingut de proteïnes i aminoàcids essencials, de les vitamines A, B, C, D i E i de certs minerals. Pel que fa al nivell proteic, les dietes hipoproteiques afecten tot l'organisme i, consegüentment, els teixits gonadals disminuïnt la producció espermàtica i alterant la qualitat i la fertilitat del semen. Les dietes hiperproteiques tenen un efecte positiu quan el mascle es troba en una situació de desnutrició (Louis i col., 1994). Entre els aminoàcids fonamentals cal destacar la metionina i la cisteïna. Un increment en la ració dels nivells de metionina-cisteïna porta a un augment de la producció espermàtica (Buxadé, 1984). D'entre les vitamines destaca la vitamina A donat que actua com a protectora de l'epiteli seminífer i evita alteracions en l'espermatogènesi (Buxadé, 1984). La vitamina A, juntament amb el complex B i la vitamina C, són molt importants per a l'estímul de la libido, el volum de l'ejaculat, i la motilitat i vitalitat espermàtiques. La carència o deficiència d'aquestes vitamines pot comportar una inhibició de la producció espermàtica (Buxadé, 1984; McDonald, 1991; Louis i col., 1994). Donat que les vitamines D₃ i E actuen en connexió amb la vitamina A, és aconsellable fer-les servir conjuntament. Fins i tot un suplement de vitamina E pot fer augmentar significativament la qualitat seminal, especialment de la concentració espermàtica (Brzezinska-Slebodzinska i col., 1995).

El mineral més important és el fósfor; la seva deficiència condueix a l'esterilitat (Buxadé, 1984). Una deficiència en manganès porta intrínsecament una davallada de la libido, mentre que una reducció dels nivells de molibdè comporta una disminució del volum seminal (Buxadé, 1984; McDonald, 1991).

L'estat nutricional també afecta la secreció de melatonina. Diversos estudis han demostrat que la restricció alimentària provoca un efecte greu en la concentració plasmàtica de melatonina en porcs exposats a fotofases llargues, per bé que no sembla tenir cap efecte en porcs exposats a fotofases curtes (Clarke i Tilbrook, 1992; Love i col, 1993; Louis i col., 1994; Weiler i col., 1996; Chacón i col., 2002).

c) L'estat sanitari

Aquest factor depèn sobretot del règim alimentari ja que una dieta sana, nutritiva i equilibrada comporta un benestar a priori de l'animal (Louis i col., 1994). En els animals malalts s'observa una disminució significativa de la qualitat i la fertilitat del semen (Buxadé, 1984). L'increment nocturn de la secreció de melatonina ha estat demostrat en tots els estats fisiològics de l'individu, exceptuant les femelles lactants (Hadley, 1996).

d) L'allotjament i la manipulació

L'espai físic destinat a cada mascle ha de ser suficientment gran per tal de permetre la mobilitat i afavorir el benestar de l'animal (Le Dividich, 1996). Segons Buxadé (1984) els mascles que disposen d'espai suficient per poder realitzar exercici físic avancen l'arribada de la pubertat i augmenten la seva libido; a més, si les cel·les són individuals s'aconsegueix un increment del volum total de l'ejaculat i de la concentració i motilitat espermàtiques.

Per tal d'obtenir un bon rendiment reproductiu del mascle porcí també és important realitzar una manipulació respectuosa i acurada, evitant al màxim les situacions estressants (Martín, 1982; Buxadé, 1984).

2.6. Obtenció de mostres i conservació del semen

La recollida de semen requereix d'unes condicions adequades a fi d'aconseguir un ejaculat de qualitat òptima. És necessari un ensinistrament previ dels mascles a pujar al maniquí a més de tenir en compte altres aspectes fonamentals com són la sala d'extraccions, el personal manipulador i l'equip utilitzat (Martí, 1982; Buxadé, 1984; Le Dividich, 1996). El lloc on se situa el maniquí ha de permetre el desencadenament dels reflexes estimulants de la libido del mascle i reunir les

condicions higièniques requerides per a l'extracció del semen (Buxadé, 1984; Le Dividich, 1996).

El personal manipulador ha de tenir cura en el tracte i utilitzar material degudament preparat en condicions higièniques i sanitàries (Buxadé, 1984; Le Dividich, 1996).

La recollida de semen en el mascle porcí es fa per masturbació manual. L'electroejaculació en el porc és dificultosa, fins i tot amb anestèsia prèvia, degut al seu caràcter poc tractable (Roth i Smidt, 1970; Bonadonna, 1989). L'extracció de semen emprant vagines artificials va ser utilitzada fins a mitjans del segle XX (McKenzie i col, 1938; Polge, 1956; Aamdal, 1959; Niwa i col, 1959; Melrose i O'Hagan, 1959; Radford, 1961; Smidt, 1965) però, avui dia, aquesta tècnica està pràcticament en desús (Martín, 1982; Hugues i Varley, 1994).

L'extracció per masturbació manual requereix de l'ús d'un guant estèril molt fi per tal de no reduir la sensibilitat de l'animal; aquest mètode simula les condicions de munta natural, és d'execució simple i, en comparació amb les altres tècniques, proporciona un nombre superior d'espermatozoides per mm³ (Niwa i col., 1959; Jondet, 1971; King i McPherson, 1973; Martín, 1982; Buxadé, 1984; Daza, 1992). Durant l'ejaculació el semen es recull dins un termos estèril i preescalfat a 37°C, a fi d'evitar el xoc tèrmic. En el termos és imprescindible col·locar una gasa estèril per tal d'eliminar la tapioca i recollir la fracció rica en espermatozoides (Martín, 1982).

El semen fresc a temperatura ambient manté les seves propietats durant tan sols 2 ó 3 hores, per tant es requereix d'un sistema de conservació (Weitze i Petzoldt, 1992). La congelació en porcí és dificultosa per la qual cosa s'opta generalment per la refrigeració (Paquignon, 1984; Johnson i col., 2000). El semen refrigerat es conserva o bé a 5°C, amb l'addició de substàncies crioprotectors, o bé a 15°C dissolt en un medi salí. En la majoria dels centres d'inseminació artificial (IA) d'arreu del món el semen es conserva diluït a 15° ja que s'obtenen millors resultats de fertilitat (Martín, 1982; Martínez, 1985; Weitze i Petzoldt, 1992).

<i>Diluent</i>	<i>Conservació del semen (dies)</i>	<i>Components</i>
Kiev	3	Glucosa, citrat sòdic, bicarbonat sòdic, etilendiaminotetraacetat (EDTA)
BTS	4-5	Glucosa, citrat sòdic, bicarbonat sòdic, EDTA, clorur potàssic
Zorpva	5	Glucosa, citrat sòdic, bicarbonat sòdic, EDTA, TRIS, àcid cítric, cisteïna, polivinilalcohol (PVA)
Reading	4-6	Glucosa, citrat trisòdic, bicarbonat sòdic, EDTA, clorur potàssic, TRIS, àcid cítric, cisteïna, PVA, trehalosa

Taula 2. Composició de diferents diluents del semen de porcí sense tenir en compte els antibiòtics (Glossop, 1991; Gordon, 1998).

Existeixen diversos tipus de diluents comercials, les característiques dels quals es resumeixen a la Taula 2, que permeten conservar el semen de porcí diluït a la proporció 1:10 sense que es produeixin canvis qualitatius durant 3 ó 4 dies. Segons Gordon (1998) els millors resultats s'obtenen amb el diluent de Bestville (BTS) tant pel que fa al temps de conservació, que es pot allargar fins a 6-7 dies, com a l'índex de fertilització. L'addició de gentamicina inhibeix el creixement bacterià amb més èxit que la penicil·lina i l'estreptomycinina (Daza, 1992).

2.7. Anàlisi microscòpica i bioquímica de l'ejaculat

La qualitat espermàtica és un dels elements clau a l'hora de determinar la capacitat fèrtil del mascle reproductor. A continuació s'exposen els paràmetres més freqüentment analitzats per tal de fer una valoració qualitativa de l'esperma de porcí: el volum i pH de l'ejaculat, la concentració, vitalitat i motilitat espermàtiques, la resistència osmòtica dels acrosomes, la morfologia espermàtica i la concentració de glúcids i proteïnes del plasma seminal (Martín, 1982; Ludwig i Frick, 1990; Bonet i col., 1991, 1993; Briz, 1994; Bonet i col., 1994, 1995; Andolz i Bielsa, 1995; Briz i col., 1996; Bonet, 1996; Pinart i col., 1998, 1999; OMS, 1999; Bonet i col., 2000; WHO, 2000).

2.7.1. El volum seminal

Vegeu Apartat 2.3: L'ejaculat (pàgs. 17, 18, 19 i 20).

2.7.2. El pH seminal

El pH de l'ejaculat de porcí oscil·la segons els autors entre 6,8 i 7,8 (Martín, 1982; Buxadé, 1984), entre 7,3 i 7,8 (Garner i Hafez, 1986) o entre 6,9 i 7,9 (Setchell, 1991). Aquests valors són similars als d'altres espècies de manífers; per exemple en cavalls el pH varia entre 7,2 i 7,8 (Bonadonna, 1989) o entre 6,2 i 7,8 (Setchell, 1991), en toros es troben valors entre 6,4 i 7,8 (Garner i Hafez, 1989) o entre 6,5 i 7,0 (Setchell, 1991), i en bous els valors oscil·len entre 5,9 i 7,3 (Garner i Hafez, 1989; Setchell, 1991). En humans els valors normals de pH varien entre 7,2 i 8,0 (Martín, 1982; Ludwig i Frick, 1990; Andolz i Bielsa, 1995; OMS, 1999; WHO, 2000). Valors per sobre o per sota dels normals són indicatius d'anomalies en el funcionament de les glàndules sexuals accessòries (Gopalkrishnan i col., 1992; Bartov i col., 1993).

2.7.3. La concentració espermàtica

Existeixen diversos mètodes de recompte de la concentració espermàtica del semen. D'una banda, es poden utilitzar els hemocitòmetres, com són les cambres de Neubauer, de Thoma-Zeib i de Bürker-Türk, o bé la cambra de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), que està especialment dissenyada per a determinar la concentració i la motilitat espermàtiques amb una gran precisió (WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002). La cambra de Makler consta de dues parts: a) una base metàl·lica circular amb dues nanses i, en el centre, un disc de vidre pla on es col·loca la mostra d'esperma ben homogeneïtzada; aquest disc té quatre suports perifèrics de 10 µm d'alçada cadascun, i b) el cobreobjectes de vidre circular que conté una reixeta gravada d'1 mm², subdividida en cent quadrets de 0,1 x 0,1 mm cadascun (Figura 8). Quan el cobreobjectes es col·loca sobre els quatre suports de la base, la mostra s'estén per un camp uniforme de 10 µm de profunditat. L'espai limitat per les dues superfícies i deu quadres de reixeta té 10⁶ ml; així doncs el nombre d'espermatozoides comptats en deu quadrets representa la seva concentració en milions per ml. Existeixen altres tècniques de recompte que es basen en la turbidimetria d'una suspensió cel·lular (Martín, 1982), la utilització de comptadors electrònics i la citometria de flux (Martín, 1982; Evenson i col., 1993).

La concentració espermàtica dels mascles porcins de 8-12 mesos d'edat varia entre 200-300 x 10⁶ espermatozoides/ml d'ejaculat (Briz, 1994; Bonet i col., 1995; Briz i col., 1995; Pinart i col., 1999); aquest valor no és especialment elevat si es compara amb el d'altres espècies domèstiques. En cavalls la concentració espermàtica oscil·la entre 100 i 200 x10⁶ espermatozoides/ml (Rasbech, 1984; Bonadonna, 1989), en toros varia entre 800 i 2.000 x10⁶ espermatozoides/ml (Rasbech, 1984; Garner i Hafez, 1989) i en bous entre 2.000 i 3.000 x10⁶ espermatozoides/ml (Rasbech, 1984; Garner i Hafez, 1989). En humans es

considera com a normal un concentració la xifra de 20×10^6 espermatozoides /ml (Andolz i Bielsa, 1995; OMS, 1999; WHO 2000).

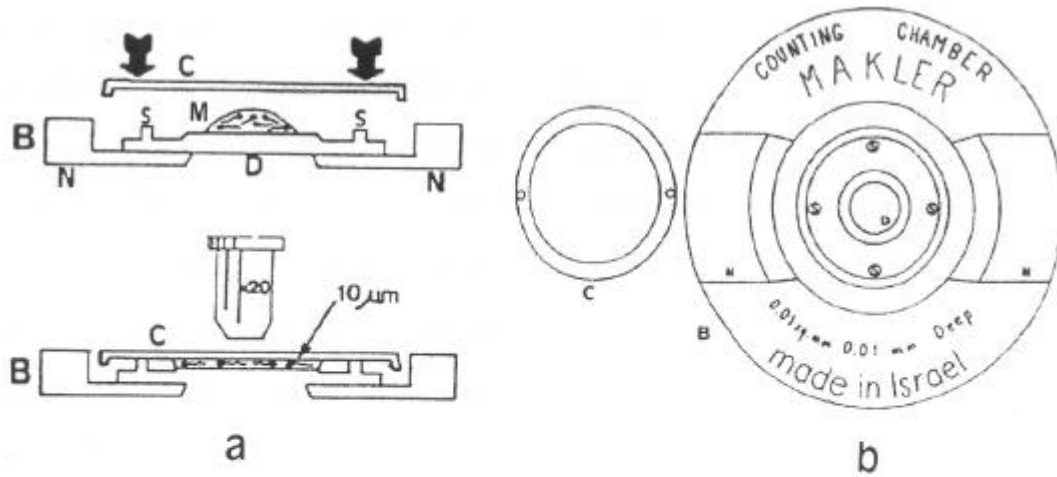


Figura 8. Dibuix de la cambra de Makler vista de perfil (a) i frontalment (b). B: base metàl·lica, C: cobreobjectes de vidre, D: disc de vidre pla, M: mostra d'esperma, N: nansa, S: suport de quarç de $10 \mu\text{m}$ d'alçada (Manual d'instruccions de la cambra de Makler, Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) (Briz, 1994).

2.7. La vitalitat espermàtica

El percentatge d'espermatozoides vius es pot valorar mitjançant tincions específiques, d'entre les quals destaquen la tinció d'eosina-blau d'anilina (Shaffer i Almquist, 1948), la tinció d'eosina-nigrosina (Dott i Foster, 1972; Garcia-Garriga i col., 1994; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002) i la tinció de blau de tripà (Sánchez, 1991). Aquestes tincions es basen en que la membrana dels espermatozoides vius és impermeable als colorants, mentre que la membrana

dels espermatozoides morts o no viables és permeable al seu pas. Així doncs, en les extensions els espermatozoides vius apareixen no tenyits i els espermatozoides morts, en canvi, es veuen intensament tenyits.

Un altre mètode sovint utilitzat és la tinció supravital amb taronja d'acridina (Evenson i col., 1980; Tejada i col., 1984; Bonet i col., 1995; Pinart i col., 1999), que es basa en les propietats d'aquest fluorocrom que emet fluorescència de color verd quan s'uneix al DNA cel·lular no alterat i fluorescència de color taronja quan s'uneix al DNA desnaturalitzat. Aquest procediment, a més, permet corroborar l'avaluació de la motilitat ja que el percentatge de cèl·lules no viables ha de ser similar al percentatge d'espermatozoides immòbils (Kvist i Björndahl, 2002).

L'ejaculat de porcí conté un 85% d'espermatozoides vius (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Briz, 1994; Bonet i col., 1995; Briz i col., 1995; Pinart i col., 1999). En humans es consideren com a normals valors entre el 65 i el 85% (Andolz i Bielsa, 1995; OMS, 1999; WHO, 2000).

2.7.5. La motilitat espermàtica

La motilitat es considera un dels paràmetres més importants en la valoració de la capacitat fecundant d'un ejaculat (Flowers, 1997; Rigau i col., 2001). Les avaluacions inclouen estimacions quantitatives i qualitatives; en la valoració quantitativa es diferencia entre espermatozoides mòbils i espermatozoides immòbils, i en la valoració qualitativa es defineix el tipus de moviment, la velocitat i la direcció dels espermatozoides mòbils (Briz i col., 1995). Hi ha nombrosos mètodes d'anàlisi de la motilitat espermàtica entre els que destaquen la mesura de la terbolesa d'una suspensió d'espermatozoides (Sokoloski i col., 1977), les tècniques videofotogràfiques (Rawlins, 1992; Lacey, 1999) i el recompte amb la cambra de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) (Kvist i

Björndahl, 2002). Darrerament s'han desenvolupat nombrosos sistemes d'anàlisi assistida per ordinador (CASMA, Computer-Assited o Computer-Automated Sperm Motility Analysis) que analitzen amb precissió el moviment des d'un punt de vista quantitatiu i qualitatiu (WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002).

En els mascles sans la freqüència d'espermatozoides amb un moviment progressiu és del 80% en porcíns (Wilson i Pond, 1981; Houpt, 1981; Martín, 1982; Briz, 1994; Bonet i col., 1995; Briz i col., 1995; Pinart i col., 1999b), entre el 60 i 70% en cavalls (Rasbech, 1984; Bonadonna, 1991), entre el 45 i el 75% en toros (Rasbech, 1984; Garner i Hafez, 1989) i entre el 60 i 80% en bens (Rasbech, 1984; Garner i Hafez, 1989). En humans el valor considerat com a normal és de com a mínim el 50% (Ludwig i Frick, 1990; Andolz i Bielsa, 1995; OMS, 1999; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002).

2.7.6. La resistència osmòtica de l'acrosoma

La determinació de la resistència osmòtica de l'acrosoma és una prova important en la valoració del semen. El test de la resistència osmòtica (ORT), descrit per primera vegada per Schilling i col. (1986), és actualment molt utilitzat i permet a les granges o centres d'inseminació artificial avaluar *a priori* la fertilitat i prolificitat dels mascles reproductors porcíns. Els valors normals de l'índex ORT a l'ejaculat de porcí es troben entre el 55 i el 67% (Schilling i Vengust, 1987; Briz, 1994; Bonet i col., 1995; Briz i col., 1995, 1996).

2.7.7. La morfologia espermàtica

La morfologia espermàtica és un dels paràmetres més importants per a l'avaluació de la qualitat seminal; existeix una correlació altament positiva entre

la freqüència d'espermatozoides madurs i la fertilitat del semen (Dufour i col., 1984; Levine, 1999; Kumar i Rani, 1999).

Existeixen diferents maneres de valorar la morfologia tant al microscopi òptic com al microscopi electrònic de transmissió i de rastreig. Encara que la morfologia espermàtica pot ser avaluada a partir de semen fresc per microscòpia de contrast de fases o de contrast interferencial de Nomarski, els millors resultats s'obtenen a partir d'extensions de semen tenyides i observades amb camp clar (Bonet i col., 1995; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002). Hi ha diferents procediments tintorials com la tinció d'hematoxilina-eosina, la tinció de Giemsa, la tinció de Papanicolaou modificada per a espermatozoides, i els mètodes panòptics ràpids de QCA (Química Clínica Aplicada, Tarragona, Espanya) i de Diff-Quick (Francisco Soria Melquizo, S.A.). Els espermatozoides són classificats en tres categories: espermatozoides madurs, espermatozoides immadurs i espermatozoides aberrants. Un ejaculat normal de porcí presenta un 90% d'espermatozoides madurs, un 78% d'espermatozoides immadurs i un 2-3% d'espermatozoides aberrants (Martín, 1982; Briz i col., 1995; Pinart i col., 1999b; Bonet i col., 1995, 2000). En toros sexualment madurs l'ejaculat conté entre el 80 i 95% (Rasbech, 1984) o entre el 65 i 95% d'espermatozoides morfològicament normals (Garner i Hafez, 1989). En bens un ejaculat de qualitat presenta entre el 80 i 95% d'espermatozoides normals (Rasbech, 1984; Garner i Hafez, 1989). En humans s'accepten com a normals ejaculats amb una freqüència d'espermatozoides madurs superior al 50% (Ludwig i Frick, 1990; OMS, 1999; WHO, 2000).

Els espermatozoides immadurs es caracteritzen per la presència de la gota citoplasmàtica a la peça de connexió (gota proximal) o a l'anell de Jensen (gota distal). Els espermatozoides aberrants presenten anomalies cefàliques i/o caudals de forma, mida o nombre (Ludwig i Frick, 1990; Briz, 1994; Briz i col., 1995; Pinart i col., 1999b; OMS, 1999; Bonet i col., 1995, 2000; WHO, 2000).

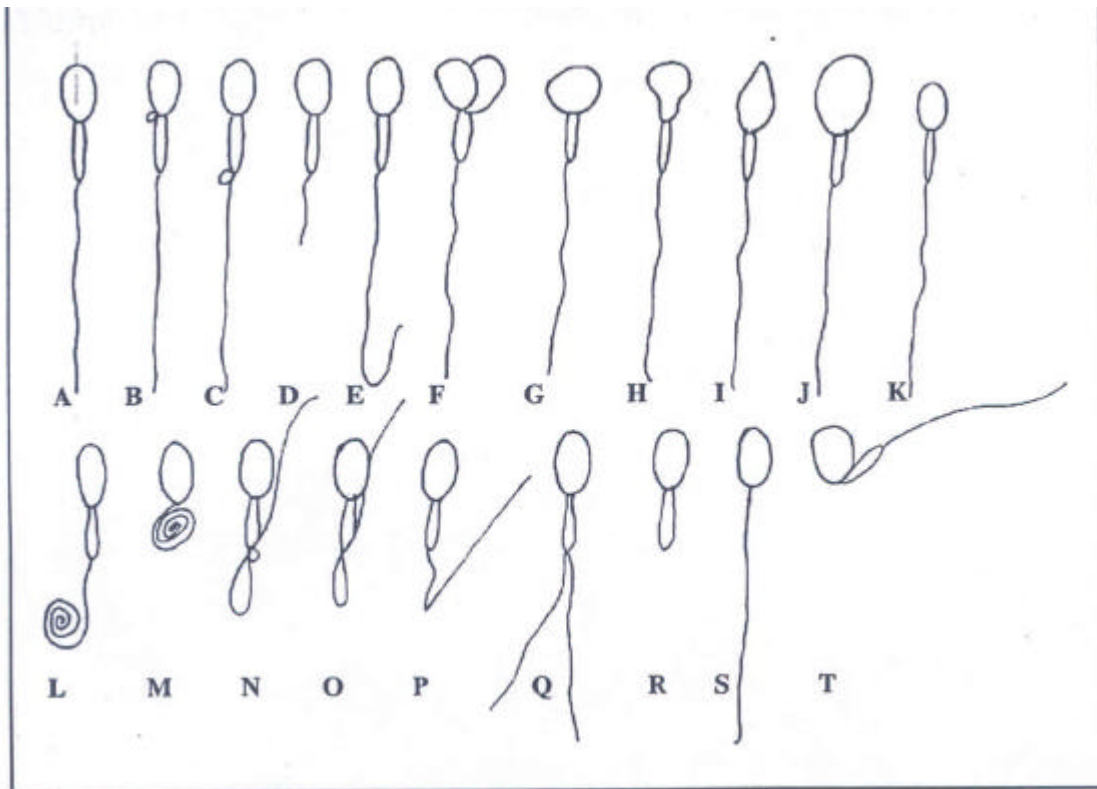


Figura 9. Morfologies spermàtiques. A: espermatozoide madur; B: espermatozoide immadur amb presència de gota proximal; C: espermatozoide immadur amb presència de gota distal; D: espermatozoide de cua curta; E: espermatozoide de cua llarga; F: espermatozoide amb dos caps; G: espermatozoide de cap arrodonit; H: espermatozoide de cap piriforme; I: espermatozoide de cap flamíger; J: espermatozoide macrocefàlic; K: espermatozoide microcefàlic; L: espermatozoide de cua totalment enrotllada per la peça terminal; M: espermatozoide de cua totalment enrotllada; N: espermatozoide immadur amb gota distal i amb la cua doblegada per l'anell de Jensen; O: espermatozoide amb la cua doblegada per l'anell de Jensen; P: espermatozoide amb la cua doblegada; Q: espermatozoide amb dues cues no fusionades; R: espermatozoide de cua curta (absència de la peça principal i la peça terminal); S: espermatozoide de cua prima (absència de beina mitocondrial); T: espermatozoide amb la cua doblegada per la peça de connexió (Briz, 1994).

A l'espècie porcina les morfoanomalies més freqüents són les de cap allargat, cap arrodonit, cap piriforme i cap doblegat; d'entre les anomalies en la mida del cap, la macrocefàlia es manifesta amb una major freqüència que la microcefàlia, i entre les anomalies en el nombre de caps, els espermatozoides bicefàlics es manifesten amb una baixa freqüència, essent rara la presència d'espermatozoides tricefàlics a l'ejaculat (Briz i col., 1996; Pinart i col., 1999b; Bonet i col., 2000). Les anomalies en la forma de la cua poden originar-se per doblegament a la peça de connexió, la peça intermèdia, l'anell de Jensen o la peça principal, o per enrotllament total o parcial. Pel que fa a les anomalies en la mida de la cua, la malformació dels espermatozoides amb cua curta es manifesta amb una major freqüència que la dels espermatozoides amb cua llarga; entre les anomalies en el nombre de cues es poden observar espermatozoides sense cua o espermatozoides amb dues cues fusionades o no (Figura 9) (Briz i col., 1996; Pinart i col., 1999b; Bonet i col., 2000).

2.7.8. La producció espermàtica

Existeixen diferents tècniques de valoració de la producció espermàtica; l'estimació de la reserva testicular d'espermatozoides (Daza, 1992) o el càlcul del nombre d'espermatozoides produïts per dia i gram de parènquima testicular (Cameron, 1982; Dadoune i Demoulin, 1993) es fan a partir de biòpsies i requereixen, en molts casos, el sacrifici de l'animal o poden, com a mínim, afectar greument la seva aptitud reproductora.

A la pràctica, un dels mètodes més emprats per estimar la producció espermàtica dels mascles consisteix en dividir el nombre d'espermatozoides totals de l'ejaculat per l'interval de dies entre recollides (Daza, 1992). A partir de l'aplicació d'aquest mètode els valors acceptats com a normals a l'espècie porcina varien segons els diferents autors, essent d'entre 30-60 x 10⁹ espermatozoides/dia (Garner i Hafez, 1996) o 10-20 x 10⁹ espermatozoides/dia

(Buxadé, 1984; Daza, 1992) o $20-28 \times 10^6$ espermatozoides/g x dia (Dadoune i Demoulin, 1993) o $15-17 \times 10^9$ espermatozoides/dia (McDonald, 1991). En toros i en cavalls es troben valors de 12×10^6 espermatozoides/g x dia (Dadoune i Demoulin, 1993) i de 16×10^6 espermatozoides/g x dia, respectivament (Dadoune i Demoulin, 1993). A l'home la producció espermàtica és de $5-6 \times 10^6$ espermatozoides/g x dia (Dadoune i Demoulin, 1993). De totes maneres, aquest és un paràmetre que varia molt en funció de l'edat, sobretot a l'espècie humana; així, es produeix un descens de la producció espermàtica associat a l'envelliment de l'individu (Buxadé, 1984; Daza, 1992; Dadoune i Demoulin, 1993).

A partir de l'estimació de la producció espermàtica es pot inferir el nombre de dosis seminals que es poden obtenir de cada ejaculat (Martín, 1982; Buxadé, 1984). El càlcul es fa tenint en compte el nombre mínim d'espermatozoides que ha de contenir una dosi seminal, que en l'espècie porcina és de 2×10^9 espermatozoides (Martín, 1982; Buxadé, 1984).

2.7.9. El contingut de sucres i proteïnes del plasma seminal

La fructosa és el principal component glucídic del plasma seminal de porcí, per bé que també conté altres sucres com la glucosa i el sorbitol (Setchell i col., 1994; Garner i Hafez, 1996; Jones i Connor, 2000). En condicions anaeròbies els glúcids confereixen energia als espermatozoides a partir de la seva fermentació fins a àcid làctic. A més s'ha demostrat que els diferents sucres del plasma seminal tenen un efecte directe sobre la motilitat i la capacitat espermàtiques en el moment de la fecundació i, fins i tot, poden interferir en la conservació del semen (Hafez, 1996; Martín, 1996; Jones i Bubb, 2000; Williams i Ford, 2001; Rigau i col., 2001, 2002).

El plasma seminal conté proteïnes que procedeixen en un 80-90% de les vesícules seminals i en un 10-20% de l'epidídim i la pròstata (Lavon i Boursnell,

1971; Saiz i col., 1991, 1993; Pérez-Pé i col., 2002). Les proteïnes del plasma tenen una acció protectora sobre els espermatozoides, neutralitzant l'efecte perjudicial dels antigens i metalls pesats, eviten l'aglutinació del semen i participen en el procés de fertilització (Martín, 1996; Strzezek i col., 2000); fins i tot s'ha demostrat que algunes proteïnes participen en el procés de capacitació i inducció de la reacció acrosòmica de l'espermatozoide mitjançant la fosforilació de residus de tirosina (Flesh i col., 1999; Pérez-Pé i col., 2002). Un descens en el contingut proteic del plasma seminal sol manifestar-se associat a una disminució de la taxa de fertilitat i prolificat de l'ejaculat (Saiz i col., 1991,1993; Louis i col., 1994; Levis, 1999; Strzezek i col., 2000; Pérez-Pé i col., 2002)

2.7.10. La fertilitat i la prolificat

Les truges presenten cicles reproductius o estrals durant tot l'any que es repeteixen a intervals de 19-23 dies (Warnick i col., 1951; Cameron, 1977; Anderson, 1993; Hühr i col., 1996). L'ovulació té lloc 38-42 hores després de l'inici de l'estre, quan aquest dura com a mínim 2 dies en femelles múltiples, o bé una mica abans si l'estre dura 1 dia en femelles nul·líparas. En femelles adultes, en les que el període d'estre és més llarg, l'ovulació es desencadena un cop transcorregut un 75% del zel (Anderson, 1993; Hühr i col., 1996).

La tècnica més habitual de detecció del zel és l'exposició a un mascle i posterior observació dels canvis fisiològics i de comportament de la femella; bàsicament aquests canvis són: dilatació, enduriment i envermelliment de la vulva, secreció de fluxe més viscos, inquietud i, fins i tot en alguns casos, lordosi o reflexe d'immobilitat (Signoret, 1989a,b; Hühr i col., 1996; Gordon, 1998). En femelles nul·líparas aquests canvis són més marcats i es poden detectar ja 2-6 dies abans del zel (Winfield, 1980; Hühr i col., 1996).

El nombre d'òocits alliberats durant l'ovulació varia de 10 a 24 segons la raça, l'edat, el nombre de parts i l'estat nutricional de la truja (Oriancourt i col., 1993). Les races xineses, com la Meishan, tenen una taxa d'ovulació més elevada i una major capacitat uterina i, en definitiva, són més prolífiques que les races occidentals, encara que els garrins solen presentar un pes corporal inferior (Johnson i col., 1985). La taxa d'ovulació augmenta amb el nombre de parts de la truja (Warnick i col., 1951; Oriancourt i col., 1993).

Pel que fa a la fecunditat, l'espècie porcina presenta índexs molt elevats (>90%); malgrat això, la mortalitat embrionària i neonatal és molt elevada: un 40% dels embrions no arriben a terme i un 6-7% dels fetus moren en el moment del part (Friend i col., 1962; Randall, 1972; Dziuk, 1979; Harrison, 1997). D'altra banda, la incidència de mortinats és màxima en aquelles garrinades que superen els 14 individus, i mínima en les que no sobrepassen els 5 individus (Dziuk, 1991). El nombre de garrins per part és d'11-12 en femelles múltiples i de 9-10 en femelles primíparas (Gordon, 1998). La durada de gestació de la truja és de 110 a 120 dies (Warnick i col., 1951; Anderson, 1993).

El rendiment reproductiu es valora com el nombre de garrins deslletats per truja i per any, considerant-se un nivell de reproducció eficient el de 2-2,4 garrinades per truja i any (Daza, 1992; Flowers, 1997). Altres paràmetres per valorar el rendiment reproductiu són el pes en néixer o en el moment del deslletament, que en condicions normals es produeix a les tres setmanes de vida (Martín, 1982; Daza, 1992). El rendiment reproductiu depèn sobretot de l'edat de la femella, començant a declinar a partir del 4 anys i mig, i del nombre de parts, arribant al seu màxim al quart o cinquè part (Daza, 1992; Flowers, 1997).

L'anàlisi de la fertilitat i la prolificitat dels mascles porcins es pot realitzar in vivo a partir de l'índex de fecunditat i el nombre d'individus de la garrinada, o bé in vitro valorant la capacitat fecundant dels espermatozoides mitjançant el test de penetració homòloga o heteròloga (Harrison, 1997; Peltoniemi i col., 1999).

La detecció de la gestació es pot realitzar a partir de l'anàlisi dels nivells d'estrògens a l'orina (Grunsell i Robertson, 1953; Jainudeen i Hafez, 1996; Gordon, 1998), l'examen del moc cervical o vaginal (Betteridge i Raeside, 1962; Jainudeen i Hafez, 1996; Gordon, 1998), la biòpsia vaginal (Done i Heard, 1968; Diehl i Day, 1973; Williamson i Hennessy, 1975; Gordon, 1998), els no retorns al zel (Cameron, 1977; Jainudeen i Hafez, 1996; Gordon, 1998), la immunodiagnosi (Jainudeen i Hafez, 1996; Gordon, 1998), la palpació rectal (Cameron, 1977; Jainudeen i Hafez, 1996; Gordon, 1998), la radiografia (Walker, 1972; Jainudeen i Hafez, 1996; Gordon, 1998), la ultrasonografia (Jainudeen i Hafez, 1996; Gordon, 1998) o l'ecografia (Botero, 1984; Hühr i col., 1996; Jainudeen i Hafez, 1996; Gordon, 1998). Meredith (1990), en un estudi comparatiu dels diferents mètodes, va concloure que els més fiables són la palpació rectal i l'ecografia.

A l'actualitat s'han desenvolupat diverses metodologies per a incrementar el rendiment reproductiu de l'espècie porcina (Hühr i col., 1996; Garcia-Allegue i col., 2001). Les tècniques de reproducció controlada tenen com a finalitat la millora del rendiment reproductiu a partir de l'augment de la taxa de concepció (escurçant, per exemple, l'interval entre parts) i la reducció de la mortalitat tant embrionària com en el moment del part (Daza, 1992).

El desenvolupament de les tècniques de maduració i fecundació in vitro (FIV) a l'espècie porcina ha estat i segueix essent difícil, si es compara amb els resultats obtinguts en altres espècies (Hafez, 1996). Nagai i col. (1984) van ser els primers en publicar resultats de FIV en bestiar porcí. Posteriorment Cheng i col. (1986) i Mattioli i col. (1989) van obtenir garrins vius mitjançant aquesta tècnica. Tot i que des d'un punt de vista científic és actualment possible obtenir garrins a partir de la FIV (Martínez i col., 2002), l'ús d'aquesta tècnica en el sector ramader és encara avui complex, donat el seu baix rendiment si es compara amb la IA (Glossop, 1991; Hühr i col., 1996).

3. EL MASCLE REPRODUCTOR PORCÍ: EFECTE DEL FOTOPERÍODE EN LA FUNCIÓ REPRODUCTORA

3.1. L'estat actual de les investigacions

En els mascles porcins existeix, malgrat ser una espècie reproductora anual, una influència de l'ambient sobre la qualitat seminal (Dufour i col., 1984; Claus i Weiler, 1985; Skinner i col., 1999; Ciereszko i col., 2000; Tast i col., 2001). El descens de la fertilitat durant els mesos d'estiu és degut a l'efecte del fotoperíode i les elevades temperatures (Steinberger, 1991). Love (1978) va demostrar en els mesos d'estiu, a més del descens de la qualitat seminal i de la libido, una disminució dels nivells plasmàtics de testosterona. Altres estudis han descrit un augment en la grandària dels testicles entre els mesos de novembre a gener, un increment progressiu de la concentració i vitalitat espermàtiques al llarg de la tardor, fins a assolir el seu valor màxim a l'hivern, i una disminució de la freqüència d'espermatozoides immadurs i aberrants (Claus i Weiler, 1985; Anderson i col., 1998). Així doncs, tal i com succeeix en el porc salvatge (Mauget, 1982), en el porc domèstic s'observa un increment de la libido i de la qualitat seminal cap al final de la tardor i al llarg de l'hivern, i una disminució a la primavera i a l'estiu (Dufour i col., 1984; Claus i Weiler, 1985; Andersson, 1998; Skinner i col., 1999; Ciereszko i col., 2000; Yellon i Tran, 2002).

De totes maneres, els efectes del fotoperíode sobre la funció reproductora del mascle porcí són molt confusos; a partir de les dades bibliogràfiques és difícil saber quin és l'efecte de la fotofase sobre la qualitat seminal dels mascles porcins. Aquesta contradicció en els resultats obtinguts pels diferents autors es deu, molt probablement, a que la majoria dels estudis s'han realitzat sota condicions variables d'intensitat de llum, temperatura i humitat ambiental, i utilitzant mascles d'edats diferents.

3.2. El grau d'innovació del present estudi

El fotoperíode és un dels factors ambientals que afecta l'eficiència reproductiva del mascle porcí. És, doncs, necessari establir amb claredat quins són els seus efectes sobre la qualitat del semen i la fertilitat i prolificitat dels mascles reproductors a partir de l'estandarització de la resta de variables ambientals (temperatura i humitat), de les variables fisiològiques (raça, edat i estat sanitari) i de les variables de maneig (règim alimentari, ritme d'extraccions i condicions de manipulació i d'allotjament), així com també a partir de l'anàlisi acurada dels resultats obtinguts al llarg del temps d'experimentació, tenint en compte que els efectes del fotoperíode sobre la qualitat del semen són solament estables i característics d'ell mateix un mes després d'haver-se produït el canvi en la fotofase (Trudeau i Sanford, 1986; Paradell, 1995).

4. EL SECTOR PORCÍ: ORGANITZACIÓ I INCIDÈNCIA EN EL MERCAT CÀRNIC

Dins el context mundial, el sector porcí té una gran importància ja que aporta el 39,2% de la producció total de carn (FAOSTAT, 2000). En els últims anys la població mundial de porcs ha augmentat considerablement, per bé que la seva distribució no és homogènia; així, Àsia conté el 60% de la població, Europa el 21%, Amèrica del Nord i Central el 10%, Amèrica del Sud el 6%, Àfrica el 2% i Oceania l'1% (Babot i col., 2001). Pel que fa a la producció de carn de porcí els percentatges mundials són del 53% a Àsia, el 30% a Europa, el 13% a Amèrica del Nord i Central, el 3% a Amèrica del Sud i l'1% a Àfrica i Oceania (EUROSTAT,2000).

A nivell mundial trobem cinc models productius que s'associen de manera general a cinc zones geogràfiques diferenciades: l'Europa Occidental, l'Europa

Oriental, Nordamèrica, Centre i Sudamèrica, i la Xina. Aquests models responen a tres grans sistemes de producció: el sistema extensiu, el sistema semiextensiu o semiintensiu i el sistema intensiu (Buxadé, 1984; Albisu i col., 1992; Babot i col., 2001).

En el sistema extensiu, en el qual l'animal s'integra al medi natural, els nivells d'exigència tècnica i els resultats productius són sensiblement inferiors als dels altres dos sistemes, en especial el sistema intensiu. A nivell mundial aquest sistema està àmpliament representat a la Xina i a Centre i Sudamèrica (Buxadé, 1984; Babot i col., 2001). En el sistema semiextensiu o semiintensiu l'animal solament s'integra de forma parcial al medi natural i la tècnica pecuària, tant pel que fa a la manipulació com a les instal·lacions, juga un paper força important. Aquest sistema s'aplica a Anglaterra, Alemanya i Estats Units (Buxadé, 1984; Martínez i col., 1998). Finalment, en el sistema intensiu l'animal s'integra en un medi artificial on els factors tècnics i econòmics fan que l'objectiu prioritari de la gestió sigui aconseguir la màxima quantitat i qualitat de producte al mínim cost. Aquest sistema productiu, que predomina a l'Europa Occidental, és el que proporciona millors resultats econòmics, malgrat que es perden la major part de les reaccions naturals de l'individu (Buxadé, 1984; Blasi i Briz, 1990; Gordon, 1998; Sloyan, 1998).

Així doncs, a partir del model ancestral, extensiu o semiextensiu, s'ha anat evolucionant en tecnologia i en selecció i millora dels exemplars fins a obtenir races modernes adaptades a la producció intensiva (Buxadé, 1984; Babot i col., 2001). Aquest desenvolupament del sistema intensiu ha permès escurçar els cicles reproductius, augmentar el nombre de sacrificis i incrementar el pes unitari dels animals sense perdre, si més no aparentment, qualitat càrnica. L'aplicació d'aquest model pot haver suposat la clau de l'expansió de la producció de carn de porc a l'Europa Occidental i, més concretament, al nostre país. Aquest model majoritari no és aplicable a l'Europa Oriental on s'han buscat sistemes productius que, encara que tinguin certs aspectes en comú amb el

sistema intensiu, es diferencien en que les explotacions són menys intensives, les races menys precoces però més resistents i les truges més pesades (Buxadé, 1984).

Les explotacions porcines intensives es poden dividir de forma jerarquizada en diferents tipus segons l'objectiu concret: les granges de selecció, de multiplicació, de producció, d'engreix i d'hibridació, i els centres d'inseminació artificial. En la porcinocultura contemporània les tècniques d'IA segueixen essent prioritàries en els sistemes de millora i producció de l'espècie porcina (Glossop, 1991; Hühr i col., 1996). L'interès concret d'aquest estudi es basa en poder adaptar a les granges de selecció i multiplicació porcina i als centres d'inseminació artificial uns mòduls ambientals que assegurin i estabilitzin al màxim el rendiment reproductiu dels mascles reproductors porcs, reduint els efectes desfavorables de les variacions ambientals estacionals i incrementant els beneficis econòmics.

Material i Mètodes

MATERIAL I MÈTODES

1. ASPECTES PREVIS

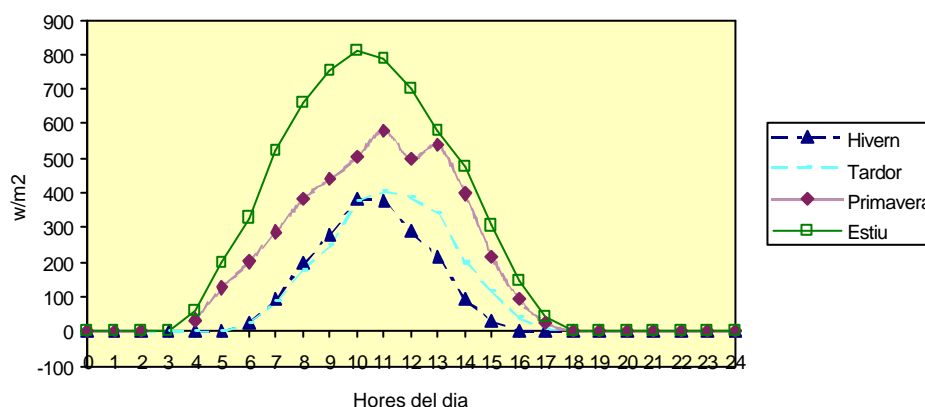
Per a la determinació dels efectes del fotoperíode sobre la qualitat seminal dels ejaculats s'han utilitzat 3 grups de mascles porcins que han estat confinats a condicions de 24, 12 i 0 hores de llum artificial, fotoperíodes 1, 2 i 3 respectivament, en una nau experimental ubicada a Siurana d'Empordà propietat de l'empresa Soragi, S.L.

De les dades obtingudes de l'Estació de La Tallada d'Empordà del Servei de Meteorologia de Catalunya (SMC), situada a pocs kilòmetres de Siurana d'Empordà, es desprèn que en les estacions de primavera i estiu el fotoperíode natural és de 12-15 hores diàries de llum i 12-9 hores diàries de foscor, i que en les estacions de tardor i hivern el fotoperíode natural és de 12-10 hores diàries de llum i 12-14 hores diàries de foscor. Així mateix, el 22 de març (equinocci de primavera) i el 21 de setembre (equinocci de tardor) el sol surt a les 5 hores i es pon a les 17 hores (12 hores de llum al dia); el 21 de juny (solstici d'estiu) el sol surt a les 4 hores i es pon a les 19 hores (15 hores de llum al dia); i el 21 de

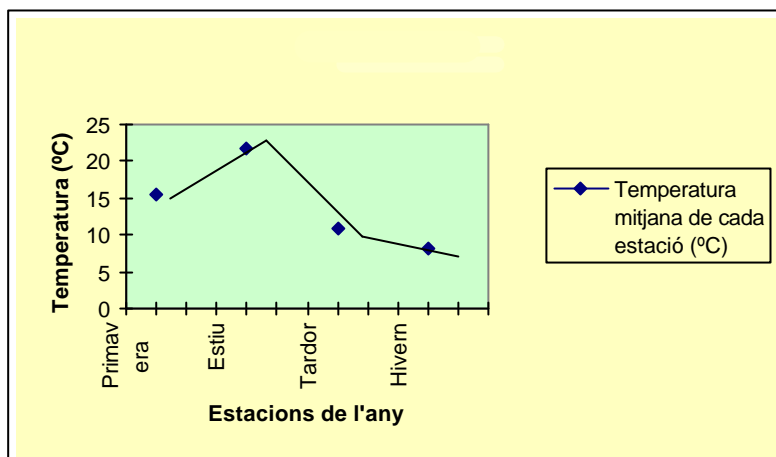
desembre (solstici d'hivern) el sol surt a les 7 hores i es pon a les 16 hores (9 hores de llum al dia) (Gràfic 1).

En el present estudi, el fotoperíode experimental 2 (12 hores diàries de llum) es correspon amb el fotoperíode dels equinoccis de primavera i tardor. Els fotoperíodes experimentals 1 i 3 (24 i 0 hores diàries de llum, respectivament), malgrat no es corresponen amb cap fotoperíode natural circannual, són d'interès justament per ser valors extrems que han de permetre detectar les diferències més notòries en la qualitat espermàtica entre els grups analitzats. Tampoc cal oblidar que, si bé a les explotacions porcines les naus disposen de finestres que permeten una seqüència del fotoperíode natural circannual, en la petita pagesia la ubicació d'algunes quadres encara es manté en condicions d'escassa il·luminació.

Als Gràfics 1 i 2 es representen les hores d'exposició i la intensitat de radiació solar diària (descomptant els dies de cel tapat, pluja, neu o boira), i les temperatures mitjanes diàries al llarg de l'any.



Gràfic 1. Exposició i intensitat de radiació solar diària. Dades obtingudes del Instituto Nacional de Meteorología (INM) a l'estació de Girona-Aeroport, a uns 50 Km de la nau experimental ubicada a Siurana d'Empordà, entre 1973 i 1990.



Gràfic 2. *Valors mitjos de temperatura de les estacions.* Dades obtingudes de l'Institut Nacional de Meteorologia (INM) a l'Estació Meteorològica de Girona-Aeroport, a uns 50 Km de la nau experimental ubicada a Siurana d'Empordà, entre 1973 i 1990.

Previ a l'inici de cada tractament experimental els mascles es van mantenir durant un període de quinze dies sota condicions de fotoperíode ambiental i temperatura constant de $21 \pm 1^\circ\text{C}$, per tal d'eliminar les variacions termomètriques circannuals característiques de cada estació (Gràfic 2).

2. DISSENY EXPERIMENTAL I PLA DE TREBALL

En aquest estudi s'han utilitzat 3 grups de 10 mascles porcins postpuberals que han estat mantinguts durant 3 mesos en diferents fotoperíodes experimentals, per bé que mantenint constants la temperatura i la humitat relativa de l'ambient,

que s'han fixat a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ i 60-75%, respectivament, així com el règim nutricional. Al llarg dels tractaments els mascles han estat sotmesos a un ritme d'extraccions de semen de 2 vegades per setmana, sense períodes de repòs sexual. Els paràmetres ambientals i de confinament fixats en aquest treball han estat considerats per molts autors com els més idonis per al rendiment reproductiu dels mascles (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Daza, 1992; Bonet i col., 1995).

De totes les mostres de semen obtingudes s'han analitzat, per a cada tractament i cada mascle, aquelles que coincideixen amb una ona epididimària, que es repeteix cada 15 dies, i amb una ona espermatogènica, que es repeteix cada 30 dies.

Per a cadascun dels tractaments, el període d'allotjament dels mascles reproductors porcins a la nau experimental i la seqüència de dates en què s'acompleixen les ones epididimàries (EP) i espermatogèniques (ES) queden reflectides a la Taula 2.

Al llarg dels tractaments s'han realitzat les següents proves de contrastació de la qualitat seminal: anàlisi del volum i pH de l'ejaculat, de la concentració, vitalitat i motilitat espermàtiques, de la resistència osmòtica dels acrosomes dels espermatozoides i de la morfologia espermàtica, i determinació de la producció espermàtica i del nombre de dosis per ejaculat. En aquelles extraccions coincidents amb la 1a ona EP (dia 15 de cada tractament) i amb la 6a ona EP i 3a ona ES (dia 90 de cada tractament) s'ha procedit a l'anàlisi bioquímica del plasma seminal i a la determinació de l'índex de fertilitat i prolificitat del semen.

Mètodes

Tractament	Fotoperíode 1 (24 hores de llum)	Fotoperíode 2 (12 hores de llum)	Fotoperíode 3 (0 hores de llum)
Fotoperíodes ambientals	Tardor del 14-10-99 al 03-11-99	Primavera del 30-03-00 al 16-04-00	Tardor del 02-10-00 al 25-10-00
Fotoperíodes experimentals			
Inici (dia 0)	04-11-99	17-04-00	26-10-00
↓	↓	↓	↓
1a ona EP (dia 15)	18-11-99	01-5-00	09-11-00
↓	↓	↓	↓
2a ona EP i 1a ona ES (dia 30)	25-12-99	15-05-00	23-11-00
↓	↓	↓	↓
3a ona EP (dia 45)	16-12-99	29-05-00	07-12-00
↓	↓	↓	↓
4a ona EP i 2a ona ES (dia 60)	30-12-99	12-06-00	21-12-00
↓	↓	↓	↓
5a ona EP (dia 75)	13-01-00	26-06-00	05-01-01
↓	↓	↓	↓
6a ona EP i 3a ona ES (dia 90)	27-01-00	10-07-00	19-01-01
↓			
7a ona EP (dia 105)			

Taula 2. Esquema resum del pla de treball que s’ha portat a terme per a la realització d’aquest estudi. Es detalla la seqüència de dates i de condicions experimentals en què van estar allotjats cada grup de mascles a la nau experimental i s’indica els períodes en què s’acompleixen les ones epididimàries (EP) i espermatoogèniques (ES). En taronja es

destaquen les ones en què, a més, es va fer l'anàlisi bioquímica del semen i l'estudi de la fertilitat i prolificitat dels mascles.

3. MATERIAL

3.1. Característiques dels mascles i obtenció del semen

Tots els mascles reproductors escollits per al treball experimental són de la raça Landrace varietat anglesa. A fi de minimitzar els efectes que la variabilitat genètica pogués produir en la qualitat dels ejaculats, tots els mascles utilitzats en l'experimentació procedeixen del mateix pare.

Per a cadascun dels 3 fotoperíodes experimentals els mascles han estat seleccionats als 8 mesos d'edat i confinats a la nau experimental, on han estat entrenats a la munta del maniquí i a l'extracció del semen per masturbació manual d'acord amb la tècnica descrita per Martín (1982) i Daza (1992). Si algun dels mascles s'ha resistit a la munta o a l'extracció del semen s'ha procedit a la seva substitució per un altre mascle de la mateixa edat. Previ al tractament, per a cada mascle s'ha analitzat l'ejaculat de les quatre primeres extraccions, determinant-ne el volum total i la concentració espermàtica. Si algun mascle ha presentat uns valors baixos en qualsevol d'aquests dos paràmetres s'ha substituït per un altre mascle d'edat similar.

Per a qualsevol dels 3 tractaments, l'experimentació s'ha iniciat quan els 10 mascles del grup han respost a la munta del maniquí i a la masturbació manual, i quan la qualitat del semen ha estat similar entre sí (Daza, 1992). Una vegada aconseguida l'homogeneïtat del grup, els mascles han estat sotmesos a condicions de fotoperíode ambiental durant 15 dies i, a continuació, al fotoperíode experimental durant 3 mesos consecutius.

Al llarg dels tractaments els mascles han estat sotmesos a un ritme d'extraccions de 2 vegades per setmana sense períodes de repòs sexual, concretament els dilluns i dijous entre les 7 i 10 hores del matí. Les extraccions de semen han estat

practicades sempre pels 2 mateixos operaris. Del total de semen ejaculat s'ha recollit només la fracció rica en espermatozoides, desestimant-se les fraccions pre i postespermàtiques. La fracció espermàtica dels ejaculats ha estat filtrada amb una gasa estèril per tal d'eliminar les masses gelatinoses procedents de la secreció de les glàndules de Cowper (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Garner i Hafez, 1996).

Les mostres han estat transportades a 15°C en una nevera Magapor des de la granja fins a les instal·lacions de la universitat. Un cop al laboratori les mostres han estat conservades a 15° C per un període inferior a 48 hores (Martín, 1982).

Finalment, l'alimentació dels mascles ha consistit en una dieta sana i equilibrada subministrant-los un pinso ric en aigua i vitamines.

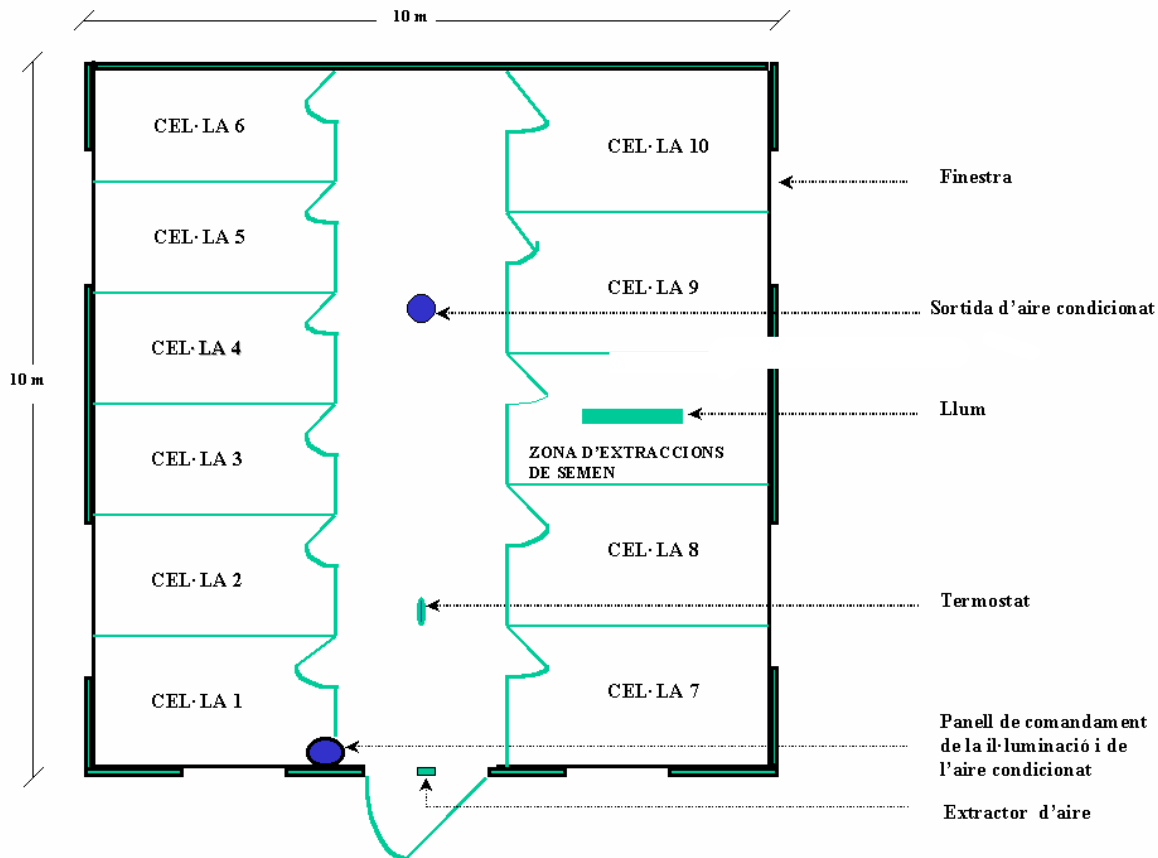
3.2. Característiques de la nau experimental

La nau experimental ha estat cedida i arranjada per l'empresa SORAGI S.L. dedicada a la selecció i multiplicació porcina, i sota les indicacions proposades per la Unitat de Reproducció Assistida en Porcí del Departament de Biologia de la Universitat de Girona. La nau, situada en el complex de granges que té l'empresa en el terme municipal de Siurana d'Empordà, té una superfície de 100 m² construïts i una alçada màxima de 3,5 m (Figura 1). Un passadís central de 10 m de longitud per 1,5 m d'amplada divideix la nau en dues files de 5 i 6 cel·les cadascuna. La superfície útil de les cel·les més grans és de 7,5 m² i la de les cel·les més petites de 6,5 m². La paret de les cel·les i del passadís té una alçada d'1,5 m. En una de les cel·les petites s'hi ha col·locat el maniquí i ha estat utilitzada com un espai reservat per a les extraccions de semen. Al llarg de tot l'experiment la nau ha allotjat un total de 30 mascles distribuïts en 3 grups de 10. La nau té 6 finestres d'uns 2 m² cadascuna que permeten una bona il·luminació natural del seu interior. D'aquestes finestres, dues es disposen a la façana

principal, a cada costat de la porta d'entrada, i les altres quatre estan distribuïdes, 2 i 2, a les parets laterals. Les finestres disposen d'un mecanisme tipus porticó català que facilita el seu tancament opac. Així, quan la nau s'ha volgut il·luminar amb llum artificial i d'intensitat controlada, 200-400 lux, els porticons s'han tancat impedit el pas de la llum natural exterior.

La il·luminació de la nau està regulada per un interruptor temporitzador que, ajustat a un rellotge horari, permet predeterminar el temps d'exposició lluminosa diària. Així mateix, la nau compta amb un sistema de climatització que permet ajustar i mantenir la temperatura ambiental a $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, integrat per una bomba de calor Saunier Duval Ref. SDCH165DRT i per tres termostats d'ambient Landis. Finalment, la nau ha estat arranjada per tal d'assolir un bon aïllament tèrmic i lluminós.

Figura 1. Representació esquemàtica de la nau experimental.



4. MÈTODES

4.1. Anàlisi de la qualitat seminal

4.1.1. Determinació del volum i el pH del semen

La determinació del volum i el pH dels ejaculats s'ha efectuat a les instal·lacions de la granja, immediatament després de la seva obtenció, a partir de la fracció rica del semen fresc conservat a 37°C.

El volum s'ha mesurat amb una probreta de 500 ml amb un rang de ± 5 ml i el pH amb un pHmetre Cole Parmer Ref pHTestr 3™ amb un rang de $\pm 0,1$ unitats de pH. Ambdós paràmetres s'han utilitzat com a estimadors de l'estat funcional de les glàndules accessòries (Briz i col., 1996; Pinart i col., 1999).

L'estudi estadístic del volum i el pH s'ha fet a partir de l'anàlisi de la variància (ANOVA) amb una significació d' $\alpha < 0.05$, emprant el programa d'SPSS versió 7.5 per a Windows. Els resultats s'expressen com a la mitjana en ml \pm SD i en unitats de pH \pm SD ($n=10$).

4.1.2. Anàlisi microscòpica del semen

Les anàlisis de la concentració, vitalitat i motilitat espermàtiques, de la resistència osmòtica dels acrosomes i la morfologia espermàtica s'han realitzat a les instal·lacions de la Universitat a partir de la fracció rica del semen diluït en BTS a la proporció 1:10 i refrigerat a 15°C, al llarg dels dos dies posteriors a la seva obtenció, seguint els protocols que es detallen a cada apartat.

Els recomptes han estat realitzats en un microscopi òptic Zeiss (Jenalumar) a 125 X i per les microfotografies s'ha utilitzat pel·lícula per a diapositiva en color Ektachrome de 160 ASA per a llum artificial de filament de tungstè.

L'estudi estadístic de les dades obtingudes s'ha fet, per a tots els paràmetres, a partir de l'anàlisi de la variància (ANOVA) amb una significació d' $\alpha < 0.05$, emprant el programa d'SPSS versió 7.5 per a Windows. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SD ($n=10$).

4.1.2.1. Concentració espermàtica

La concentració espermàtica s'ha determinat al microscopi òptic de contrast de fases utilitzant la cambra de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), d'acord amb el protocol següent (Ludwig i Frick, 1990; Briz, 1994; Pinart, 1997; Bonet i col., 1995, 2000; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002):

- 1) Prepareu la cambra de Makler (netejan-la acuradament). Per tal d'assegurar-se que les superfícies estan netes i sense pols, es col·loca el cobreobjectes sobre els quatre suports del portaobjectes. Si les superfícies són netes apareixeran anells de colors en els quatre punts de contacte (anells de Newton); aquests anells són més visibles si s'observen contra llum fluorescent reflectida.
- 2) Immobilitzeu els espermatozoides col·locant 2 ml de la mostra homogeneïtzada en un tub d'assaig i submergint-lo durant 5 minuts en aigua a 50-60°C.
- 3) Dipositeu una gota (5 μ l) d'aquesta esperma pretractada i homogeneïtzada a la cambra de Makler, evitant la formació de bombolles; és recomanable que la gota s'escampi per tota la superfície del disc.
- 4) Cobriu amb el portaobjectes, fent pressió per tal que apareguin els anells de colors en els quatre suports; aquest fet garanteix que la profunditat de la cambra sigui de 10 μ m.

- 5) Dipositeu la cambra amb la mostra en el microscopi de contrast de fases i feu l'observació; la retícula està dividida en 10 files de 10 requadres, és a dir en 100 requadres de 0,01 mm².
- 6) Realitzeu el recompte dels espermatozoides (SPZ) situats en un fila de 10 requadres. Per tal d'assegurar-se que els recomptes són correctes cal comptar, com a mínim, 3 fileres de 10 requadres i obtenir-ne la mitjana i la desviació típica (el recompte es fa sempre de les mateixes fileres: 2a, 3a i 5a, per exemple).
- 7) Calculeu la concentració espermàtica (CE) aplicant la fórmula següent:

$$CE [Nre SPZ \times 10^6/ml] = Nre SPZ \text{ en } 10 \text{ requadres} \times 10^6 \times \text{factor de dilució}$$

4.1.2.2. Vitalitat espermàtica

La vitalitat espermàtica s'ha determinat al microscopi òptic de camp clar aplicant la tinció d'Eosina-Nigrosina, d'acord amb el protocol següent (Pomerol i Arrondo, 1994; Andolz i Bielsa, 1995; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002):

- 1) Poseu una gota de semen sobre un portaobjectes col·locat sobre una placa escalfadora a 37°C i barregeu-la amb una gota d'Eosina Y al 5% en solució salina isotònica (9 g ClNa/l).
- 2) Afegiu una gota de Nigrosina al 10% i barregeu. Feu l'extensió.
- 3) Observeu i compteu un total de 200 espermatozoides establint-ne el nombre d'espermatozoides tenyits de vermell per l'eosina (espermatozoides morts o no viables) i el nombre d'espermatozoides no tenyits (espermatozoides vius o viables).

4) Calculeu la vitalitat espermàtica (VE) aplicant la fórmula següent:

$$\text{VE (\% SPZ vius)} = \frac{\text{Nre SPZ totals} - \text{Nre SPZ morts}}{\text{Nre SPZ totals}} \times 100$$

4.1.2.3. *Motilitat espermàtica*

La motilitat espermàtica s'ha determinat mitjançant la microscòpia òptica de contrast de fases amb la cambra de Makler (Keel i Webster, 1990), d'acord amb el protocol següent (Ludwig i Frick, 1990; Briz, 1994; Pinart, 1997; Bonet i col., 1995, 2000; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002):

- 1) Poseu 2 ml de semen en un tub d'assaig al bany maria en una estufa a 37°C durant 5 minuts.
- 2) Netegeu i assequeu la cambra.
- 3) Barregeu la mostra i dipositeu una petita gota en el centre del disc.
- 4) Dipositeu el cobreobjectes damunt dels quatre suports.
- 5) Observeu sobre platina escalfadora a 37°C després d'haver esperat 5 minuts.
- 6) Realitzeu el recompte dels espermatozoides immòbils situats en una fila de 10 requadres. Per tal d'assegurar-se que els recomptes són correctes cal comptar, com a mínim, tres fileres de 10 requadres i obtenir-ne la mitjana i la desviació típica (el recompte es fa sempre de les mateixes fileres: 2a, 3a i 5a, per exemple).
- 7) Calculeu la motilitat espermàtica (ME) aplicant la fórmula següent:

$$\text{ME (\% SPZ mòbils)} = \frac{\text{Nre SPZ totals} - \text{Nre SPZ immòbils}}{\text{Nre SPZ totals}} \times 100$$

Mètodes

4.1.2.4. *Resistència osmòtica dels acrosomes*

La resistència osmòtica dels acrosomes dels espermatozoides s'ha determinat al microscopi òptic de contrast de fases segons la tècnica descrita per Schilling i Vengust (1987). El procediment que cal seguir és el següent (Ludwig i Frick, 1990; Briz, 1994; Pinart, 1997; Bonet i col., 1995, 2000):

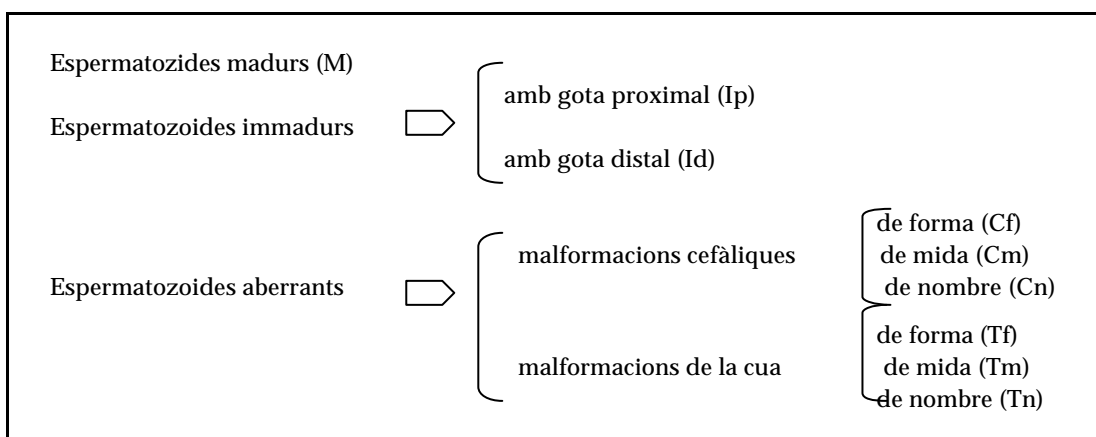
- 1) Prepareu dues solucions aquoses de citrat sòdic: una isotònica de 300 mOsmol (3,42 g de citrat sòdic dihidratat en 100 g de dissolució) i una altra hipotònica de 150 mOsmol (1,14 g de citrat sòdic dihidratat en 100 g de dissolució).
- 2) Poseu 1 ml d'esperma en 3 ml de solució isotònica i 1 ml d'esperma en 3 ml de solució hipotònica.
- 3) Incubeu al bany maria a 39°C durant 15 minuts.
- 4) Poseu una gota de cada flascó en un portaobjectes i observeu l'alteració produïda en els acrosomes dels espermatozoides.
- 5) Compteu un total de 200 espermatozoides per cada solució diferenciant entre espermatozoides amb l'acrosoma resistent i espermatozoides amb l'acrosoma alterat.
- 6) Calculeu la resistència osmòtica dels acrosomes (ORT) aplicant per al medi isotònic i el medi hipotònic la fórmula següent:

$$\text{ORT (\% SPZ resistents)} = \frac{\text{Nre SPZ totals} - \text{Nre SPZ danyats}}{\text{Nre SPZ totals}} \times 100$$

4.1.2.5. *Morfologia espermàtica*

La morfologia espermàtica ha estat observada al microscopi òptic de camp clar d'acord amb el protocol següent (Briz, 1994; Pinart, 1997; Pinart i col., 1998; Bonet i col., 1995, 2000; WHO, 2000; Kvist i Björndahl, 2002):

- 1) Poseu una gota de semen refrigerat sobre un portaobjectes, feu una extensió i deixeu-la assecar a l'aire.
- 2) Teniu les extencions obtingudes seguint el mètode Panòptic Ràpid de QCA que conté tres reactius A, B i C (Francisco Soria Melquizo, S.A.). El reactiu A és una solució metílica de triarilmetà i té propietats fixadores. El reactiu B és una solució vermellosa tamponada de xantè i actua com a colorant basòfil. El reactiu C és una solució blavosa tamponada de tiazina i té les propietats d'un colorant acidòfil. El mètode consisteix en submergir les preparacions durant deu segons (deu immersions d'un segon) en cadascun dels reactius, deixant-les escórrer entre reactiu i reactiu. Finalment, cal rentar-les amb aigua destil·lada i, deixant assecar completament l'extensió, es munta en bàlsam o qualsevol altre medi de muntatge sintètic hidròfob com l'Entellan o el DePeX.
- 3) Observeu a 400 X i feu el recompte de 1000 espermatozoides d'acord amb la classificació següent:



Els resultats s'expressen en % d'espermatozoides madurs, % d'espermatozoides immadurs i % d'espermatozoides aberrants.

Mètodes

4.1.2.6. *Producció espermàtica*

Per a determinar la producció espermàtica (PE) s'ha calculat el nombre d'espermatozoides (concentració x volum) de cada ejaculat; el valor obtingut s'ha dividit pel nombre de dies transcorreguts entre dues ejaculacions consecutives (Cameron, 1982; Daza, 1992). En el present estudi donat que els mascles s'han mantingut a un ritme constant de 2 extraccions de semen per setmana, l'interval de temps entre extraccions utilitzat per al càlcul ha estat de 3,5 dies.

$$PE \text{ (Nre SPZ/dia)} = \frac{E}{n}$$

essent:

E = nombre total d'espermatozoides presents a l'ejaculat (concentració x volum).

n = dies transcorreguts entre dues ejaculacions consecutives.

4.1.2.7. *Nombre de dosis seminals*

Les dosis seminals destinades a IA han estat preparades a partir de la fracció rica diluïda en BTS, tenint en compte que el volum final ha de ser de 80 ml i el nombre d'espermatozoides de $2-3 \times 10^9$ (Martín, 1982; Buxadé, 1984).

Per saber quin és el nombre de dosis seminals (ND) que es poden obtenir a partir d'un ejaculat s'ha aplicat la fórmula següent (Martín, 1982; Buxadé, 1984):

$$ND \text{ (Nre dosis/ejaculat)} = \frac{E}{2 \times 10^9 \text{ SPZ}}$$

essent:

E = nombre total d'espermatozoides presents a l'ejaculat (concentració x volum).

4.2. Anàlisi bioquímica del semen

L'anàlisi bioquímica del semen s'ha efectuat al laboratori de Reproducció Animal de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, a partir de la fracció rica del semen diluïda en la proporció 1:10 en BTS. Les mostres han estat centrifugades a 1500 rpm durant 5 minuts a fi de separar del plasma seminal els elements figurats. El plasma seminal obtingut ha estat diluït en la proporció 1:5 en tampó de càrrega (Laemmli, 1970) i conservat a -20°C fins a la seva anàlisi (Ballester, 2002).

4.2.1. Determinació del contingut de proteïna total

El mètode que s'ha utilitzat per a determinar la quantitat de proteïna total ha estat el descrit per Bradford (1976) i que es basa en la mesura de l'absorbància d'una solució mitjançant un espectofotòmetre.

L'estudi estadístic de la quantitat de proteïna total s'ha fet a partir de l'anàlisi de la variància (ANOVA) amb una significació d' $\alpha < 0.05$, emprant el programa d'SPSS versió 7.5 per a Windows. Els resultats s'expressen com a la mitjana en μg de proteïna / μl de plasma seminal \pm SD ($n=10$).

4.2.2. Identificació de les proteïnes amb residus fosforil·lats de tirosina

4.2.2.1. *Electroforesi*

Just abans de carregar les mostres de plasma seminal al gel de l'electroforesi, aquestes s'han bullit durant 3 minuts per tal que el tampó de càrrega es mantingui fluid.

Per a la determinació del patró de bandes i la detecció de proteïnes amb residus de tirosina fosforilades del plasma seminal mitjançant la tècnica del Western Immunoblotting s'ha realitzat una electroforesi vertical en gel de poliàcrilamida del 8% (SDS-PAGE, Laemmli, 1970). Per a l'electroforesi s'han carregat 25 µg de proteïna. Una vegada carregat el gel, aquest s'ha transferit a una membrana de nitrocel·lulosa a 100 V durant 30 minuts.

4.2.2.2. *Tinció amb Roig de Ponceau*

Com a pas previ a la realització del Western Immunoblotting s'ha comprovat que la càrrega de proteïna (25 µg) i la transferència fossin correctes tenyint la membrana transferida amb Roig de Ponceau d'acord amb el protocol següent (Ballester, 2002):

- 1) Renteu breument la membrana amb aigua destil·lada.
- 2) Tenyiu amb la solució de Roig Ponceau [3% àcid triclor-acètic i 0,2% Roig de Ponceau (SIGMA[®])] durant 1 minut en agitació.
- 3) Renteu la membrana amb aigua destil·lada per eliminar l'excés de colorant fins que observeu el patró de bandes de proteïna correctament.
- 4) Renteu la membrana amb solució tamponada de fosfat salí (PBS) amb un 0,05% de poli-oxietilen-sorbitan monolaurat [Tween 20 (SIGMA[®])] fins que s'hagi eliminat tot el colorant.

4.2.2.3. *Western Immunoblotting*

La tècnica del Western Immunoblotting emprada s'explicita a continuació (Burnet, 1981):

- 1) Incubeu la membrana en la solució de l'anticòs primari PY20 (Transduction Laboratories[®]. Ref. 610000) a una dilució 1:1000 en PBS/0,05% Tween 20/3% BSA durant 12 hores a temperatura ambient.
- 2) Feu un bloqueig de la reacció antígen-anticòs primari amb albúmina sèrica bovina (BSA) al 3% en PBS/Tween 20 al 0,05% durant 1 hora a temperatura ambient, per tal d'evitar unions inespecífiques.
- 3) Feu 2 ó 3 rentats amb PBS/Tween 20.
- 4) Incubeu amb l'anticòs secundari α -mouse a una dilució 1:2000 en PBS/0,05% Tween 20/3% BSA durant 1 hora a temperatura ambient.
- 5) Feu 2 ó 3 rentats de la membrana amb PBS/Tween 20 a temperatura ambient.
- 6) Reveleu la membrana mitjançant SuperSignal[®]West Dura Extended Duration Substrate (Mattson i Bellehumer, 1996) de PIERCE[®], producte quimioluminiscent d'elevada sensibilitat, sobre pel·lícula fotogràfica (AGFA[®]), de 15 segons a 1 minut.

4.2.3. Determinació del contingut de fructosa, glucosa i sorbitol del plasma seminal

Les concentracions de fructosa, glucosa i sorbitol del plasma seminal han estat determinades enzimàticament segons els protocols descrits per Beutler (1984) i Kunst i col. (1984). Aquests protocols es basen en provocar reaccions de fosforil·lació i posterior detecció del consum d'ATP mitjançant la mesura de l'absorbància en un espectrofotòmetre. Concretament les reaccions són: (1) la

transformació de la fructosa a fructosa-6-P, amb consum d'1 ATP, mitjançant l'acció d'una hexoquinasa, (2) el pas de fructosa-6-P a glucosa-6-P mitjançant una isomerasa, (3) la transformació de glucosa-6-P a gluconat-6-P amb la reducció d'un NADP, i (4) la reacció d'oxidació en el pas de sorbitol a fructosa mitjançant l'acció de l'enzim sorbitol deshidrogenasa i la reducció de NAD. Les determinacions han estat portades a terme després d'adaptar els mètodes esmentats a l'autoanalitzador Cobas Bio (Cobas Bio, Roche Biomedica; Basel, Switzerland) agafant alíqüotes de 5 µl per a cada mostra.

L'estudi estadístic del contingut de fructosa, glucosa i sorbitol s'ha fet a partir de l'anàlisi de la variància (ANOVA) amb una significació d' $\alpha < 0.05$ emprant el programa d'SPSS versió 7.5 per a Windows. Els resultats s'expressen com a la mitjana en mmol/L \pm SD ($n=10$).

4.3. Estudi de la fertilitat i prolificitat dels mascles

Per a l'estudi de la fertilitat i prolificitat dels mascles en els diversos tractaments s'ha procedit a l'obtenció de dosis seminals (vegeu Apartat 4.1.2.7, pàg. 63) i posterior inseminació artificial (IA) de femelles.

L'índex de fertilitat dels mascles s'ha valorat a partir del nombre de femelles prenyades per ejaculat (Chemineau i col., 1993). La detecció de les femelles gestants s'ha fet per ecografia 25 dies després de la seva IA (Botero, 1984; Hühr i col., 1996; Gordon, 1998). La prolificitat s'ha determinat en el moment del part a partir del nombre de garrins vius i morts (Gordon, 1998).

Cada mascle de cada grup experimental ha proporcionat les dosis per inseminar dues femelles diferents, una a l'inici i l'altra al final del tractament experimental. Totes les femelles utilitzades per a la IA són també de la raça Landrace varietat anglesa, d'entre 2 i 3 anys d'edat, múltipares i procedeixen del mateix pare. Totes elles han estat inseminades per duplicat en dies consecutius a partir de les

12-24 hores des de l'inici del zel ja que s'ha comprovat que així augmenta la probabilitat d'embaràs (Chemineau i col., 1993; Gordon, 1998).

La detecció del zel ha consistit en l'exposició de les femelles a un mascle amb bona libido i l'observació dels canvis fisiològics (dilatació, enduriment i envermelliment de la vulva, secreció de flux més viscos) i de comportament (inquietud i lordosi o reflex d'immobilitat) que es desencadenen en elles (Signoret, 1989a,b; Hühr i col., 1996; Gordon, 1998).

Capítol 1

**Qualitat espermàtica de l'ejaculat
de mascles exposats a condicions
ambientals de primavera i tardor**

RESULTATS

Donat que no s'han observat diferències significatives entre els mascles de cada grup experimental, per a cada un dels paràmetres seminals, s'ha calculat el valor mig utilitzant les dades de les extraccions dels deu mascles. Els resultats s'expressen com la mitjana \pm SD ($n=10$).

1. Estudi comparatiu del volum seminal

El volum seminal dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor és de $186,09 \pm 58,58$ ml i $158,00 \pm 39,58$ ml, respectivament (Taula 1, Gràfic 1).

Així doncs, no hi ha diferències estadísticament significatives en el volum seminal entre els mascles mantinguts en condicions ambientals de primavera i els mascles mantinguts en condicions ambientals de tardor ($P=0,1650$).

2. Estudi comparatiu del pH seminal

El pH del semen és de $7,22 \pm 0,15$ unitats en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i de $7,60 \pm 0,24$ unitats en els mascles mantinguts en condicions de tardor (Taula 1, Gràfic 2).

El pH seminal dels mascles exposats a condicions de tardor és significativament superior al dels mascles exposats a condicions de primavera ($P < 0,0001$).

3. Estudi comparatiu de la concentració espermàtica

La concentració espermàtica dels mascles mantinguts a condicions ambientals de primavera i tardor és de 444.352 ± 95.782 spz x 10^3 /ml i de 202.297 ± 68.346 spz x 10^3 /ml, respectivament (Taula 1, Gràfic 3).

En els mascles mantinguts en condicions de tardor la concentració espermàtica és significativament inferior a la dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera ($P < 0,0001$).

4. Estudi comparatiu de la vitalitat espermàtica

En els mascles sotmesos a condicions ambientals de primavera la vitalitat espermàtica és de $83,35 \pm 9,40\%$ i en els mascles sotmesos a condicions ambientals de tardor de $87,88 \pm 8,91\%$ (Taula 1, Gràfic 4).

Així doncs, no hi ha diferències significatives en la vitalitat espermàtica entre els mascles mantinguts en condicions ambientals de primavera i en condicions ambientals de tardor ($P = 0,3440$).

5. Estudi comparatiu de la motilitat espermàtica

La freqüència d'espermatozoides mòbils en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor és de $98,00 \pm 0,96\%$ i de $98,51 \pm 0,75\%$, respectivament (Taula 1, Gràfic 5).

Per tant, no existeixen diferències significatives entre ambdós grups de mascles en la motilitat espermàtica ($P=0,9220$).

6. Estudi comparatiu de la resistència osmòtica

6.1. Medi isotònic

La freqüència, en medi isotònic, d'espermatozoides amb l'acrosoma normal és de $83,75 \pm 10,33\%$ en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i de $94,01 \pm 5,41\%$ en els mascles mantinguts en condicions de tardor (Taula 1, Gràfic 6.1).

No hi ha diferències estadísticament significatives en la resistència osmòtica dels acrosomes en medi isotònic entre els mascles mantinguts en condicions ambientals de primavera i de tardor ($P=0,5580$).

6.2. Medi hipotònic

En medi hipotònic la freqüència d'espermatozoides amb l'acrosoma normal en condicions ambientals de primavera i tardor és de $64,67 \pm 10,67\%$ i de $51,73 \pm 11,46\%$, respectivament (Taula 1, Gràfic 6.2).

En els mascles exposats a condicions de primavera la resistència osmòtica dels acrosomes en medi hipotònic és significativament superior a la dels mascles exposats a condicions de tardor ($P < 0,0001$).

7. Estudi comparatiu de la morfologia espermàtica

7.1. Espermatozoides madurs

La freqüència d'espermatozoides madurs és de $85,21 \pm 3,11\%$ en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i de $79,56 \pm 8,89\%$ en els mascles exposats a condicions de tardor (Taula 1, Gràfic 7.1).

Així doncs, no s'observen diferències estadísticament significatives entre tractaments ($P=0,1740$).

7.2. Espermatozoides immadurs

La freqüència d'espermatozoides immadurs en els mascles mantinguts en condicions ambientals de primavera i tardor és de $8,69 \pm 2,21\%$ i de $9,61 \pm 3,42\%$, respectivament (Taula 1, Gràfic 7.2).

No existeixen diferències significatives entre ambdós grups de mascles en la freqüència d'espermatozoides immadurs ($P=0,0700$).

7.2.1. Gota citoplasmàtica proximal

La freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal és de $4,95 \pm 1,30\%$ en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i de $5,91 \pm 4,83\%$ en els mascles exposats a condicions de tardor (Taula 1, Gràfic 7.2.1).

Les diferències entre ambdós tractaments no són estadísticament significatives ($P=0,6320$).

7.2.2. Gota citoplasmàtica distal

La freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor és de $3,74 \pm 1,00\%$ i de $3,70 \pm 1,75\%$ respectivament (Taula 1, Gràfic 7.2.2).

No existeixen diferències significatives entre els grups en la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal ($P=0,9000$).

7.3. Espermatozoides aberrants

En els mascles mantinguts en condicions ambientals de primavera la freqüència d'espermatozoides aberrants és de $6,01 \pm 2,20\%$ i en els mascles mantinguts en condicions ambientals de tardor de $10,79 \pm 5,43\%$ (Taula 1, Gràfic 7.3).

La freqüència d'espermatozoides aberrants no difereix de forma estadísticament significativa entre ambdós grups ($P=0,4330$).

7.3.1. Anomalies en la forma del cap

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor és de $0,87 \pm 0,49\%$ i de $1,48 \pm 0,78\%$, respectivament (Taula 1, Gràfic 7.3.1).

Així doncs, la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap és significativament superior en els mascles mantinguts en condicions ambientals de tardor que en els mascles mantinguts en condicions de primavera ($P=0,0010$).

7.3.2. Anomalies en la mida del cap

En els mascles exposats a condicions de primavera la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap és de $0,33 \pm 0,28\%$, mentre que en els mascles mantinguts en condicions de tardor és de $0,52 \pm 0,25\%$ (Taula 1, Gràfic 7.3.2).

La freqüència d'espermatozoides amb aquesta anomalia és significativament superior en el tractament de tardor que en el tractament de primavera ($P=0,0330$).

7.3.3. Anomalies en el nombre de caps

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor és de $0,29 \pm 0,24\%$ i de $0,26 \pm 0,18\%$, respectivament (Taula 1, Gràfic 7.3.3).

No existeixen diferències estadísticament significatives en la freqüència d'aquesta malformació entre els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,9000$).

7.3.4. Anomalies en la forma de la cua

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor és de $3,35 \pm 2,97\%$ i de $6,93 \pm 7,98\%$, respectivament (Taula 1, Gràfic 7.3.4).

Aquestes diferències entre tractaments no són estadísticament significatives ($P=0,0760$).

7.3.5. Anomalies en la mida de la cua

En els mascles sotmesos a condicions de tardor ($1,40 \pm 0,57\%$) la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua és significativament superior ($P=0,0030$) a la dels mascles sotmesos a condicions de primavera ($0,90 \pm 0,38$) (Taula 1, Gràfic 7.3.5).

7.3.6. Anomalies en el nombre de cues

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues és de $0,27 \pm 0,16\%$ en els mascles exposats a condicions ambientals de primavera i de $0,20 \pm 0,15\%$ en els mascles exposats a condicions ambientals de tardor (Taula 1, Gràfic 7.3.6).

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues és significativament superior en els mascles mantinguts en condicions de primavera que en els mascles mantinguts en condicions de tardor ($P=0,0420$).

8. Estudi comparatiu de la producció espermàtica

La producció espermàtica dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor és de $23,63 \pm 15,52$ spz x 10^9 /dia i de $9,13 \pm 11,73$ spz x 10^9 /dia, respectivament (Taula 1, Gràfic 8).

Així doncs, la producció espermàtica en els mascles exposats a condicions de tardor és significativament inferior a la dels mascles exposats a condicions de primavera ($P < 0,0001$).

9. Estudi comparatiu del nombre de dosis seminals

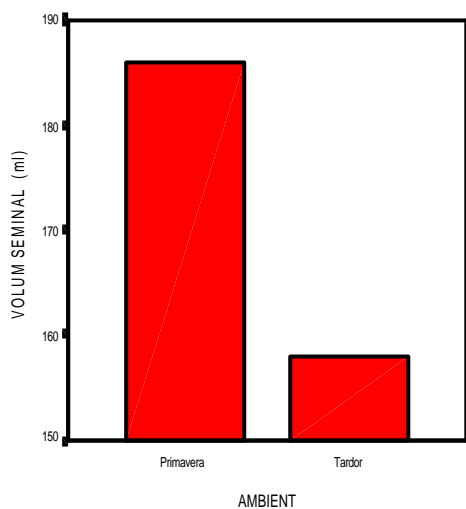
El nombre de dosis seminals per ejaculat és de $39,40 \pm 7,76$ en els mascles confinats a condicions de primavera i de $15,49 \pm 5,86$ en els mascles exposats a condicions de tardor (Taula 1, Gràfic 9).

El nombre de dosis seminals per ejaculat és significativament superior en els mascles exposats a condicions de primavera que en els mascles exposats a condicions de tardor ($P < 0,0001$).

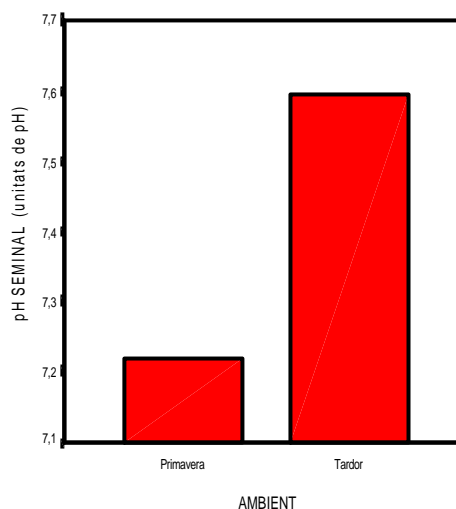
10. Taula i gràfics

<i>Paràmetres</i>	<i>Condicions ambientals</i>	
	<i>Primavera</i>	<i>Tardor</i>
Volum seminal (ml)	186,09 ± 58,58	158,00 ± 39,58
PH seminal (unitats de pH)	7,22 ± 0,15	7,60 ± 0,24 ¹
Concentració espermàtica (spz x 10 ³ /ml)	444.352 ± 95.782	202.297 ± 68.346 ¹
Vitalitat espermàtica (% spz vius)	83,35 ± 9,40	87,88 ± 8,91
Motilitat espermàtica (% spz mòbils)	98,00 ± 0,96	98,51 ± 0,75
Resistència osmòtica (% spz resistents)		
Medi isotònic	83,75 ± 10,33	94,01 ± 5,41
Medi hipotònic	64,67 ± 10,67	51,73 ± 11,46 ¹
<i>Morfologia espermàtica</i>		
Espermatozoides madurs (%)	85,21 ± 3,11	79,56 ± 8,89
Espermatozoides immadurs (%)	8,69 ± 2,21	9,61 ± 3,42
gota proximal	4,95 ± 1,30	5,91 ± 4,83
gota distal	3,74 ± 1,00	3,70 ± 1,75
Espermatozoides aberrants (%)	6,01 ± 2,20	10,79 ± 5,43
anomalies en la forma del cap	0,87 ± 0,49	1,48 ± 0,78 ¹
anomalies en la mida del cap	0,33 ± 0,28	0,52 ± 0,25 ¹
anomalies en el Nre de caps	0,29 ± 0,24	0,26 ± 0,18
anomalies en la forma de la cua	3,35 ± 2,97	6,93 ± 7,98
anomalies en la mida de la cua	0,90 ± 0,38	1,40 ± 0,57 ¹
anomalies en el Nre de cues	0,27 ± 0,16	0,20 ± 0,15 ¹
Producció espermàtica (Nre d'spz x 10 ⁹ / dia)	23,63 ± 15,52	9,13 ± 11,73 ¹
Dosis seminals (Nre de dosis seminals / ejaculat)	39,40 ± 7,76	15,49 ± 5,86 ¹

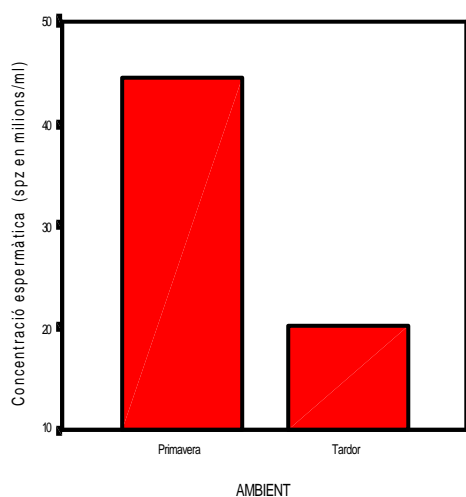
Taula 1. Paràmetres seminals dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor. ¹ Valors estadísticament diferents entre els dos grups.



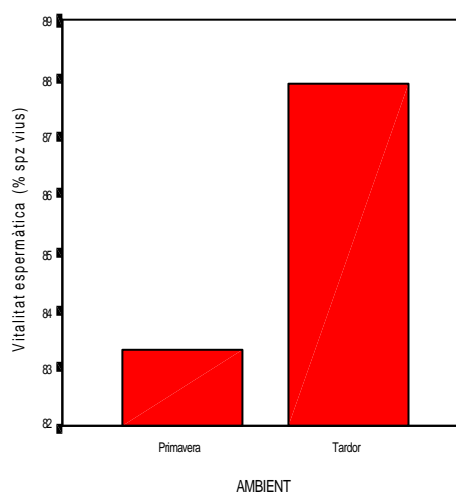
Gràfic 1. Volum seminal dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,1650$).



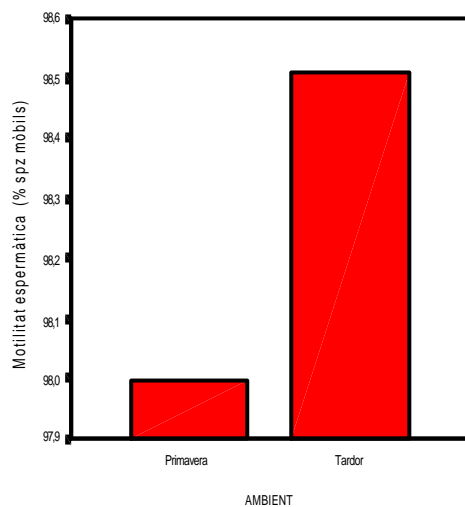
Gràfic 2. pH seminal dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P<0,0001$).



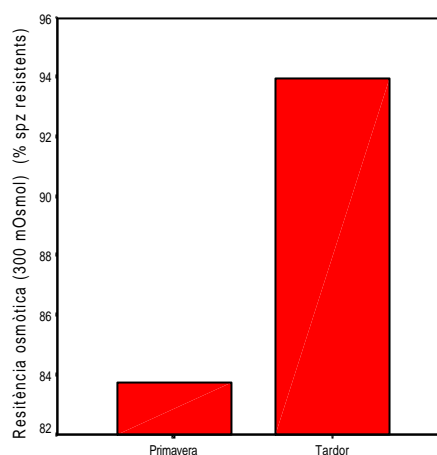
Gràfic 3. Concentració espermàtica dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P<0,0001$).



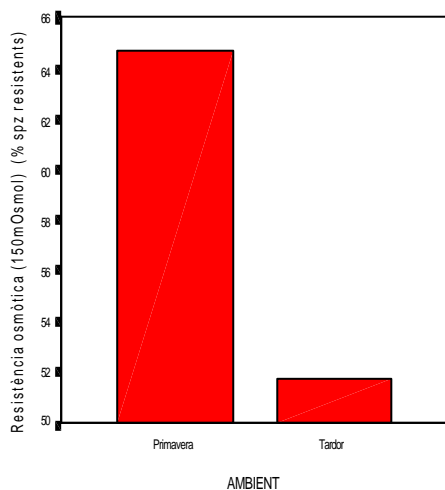
Gràfic 4. Vitalitat espermàtica dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,3440$).



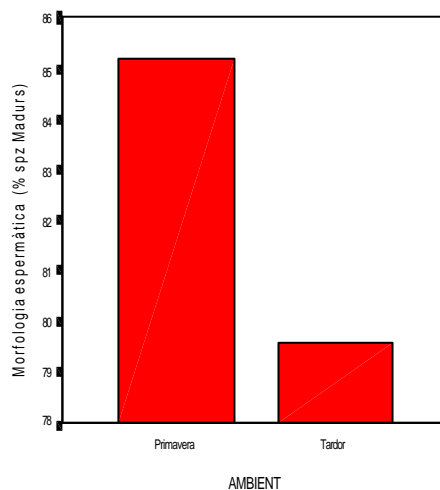
Gràfic 5. Motilitat espermàtica dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,9220$).



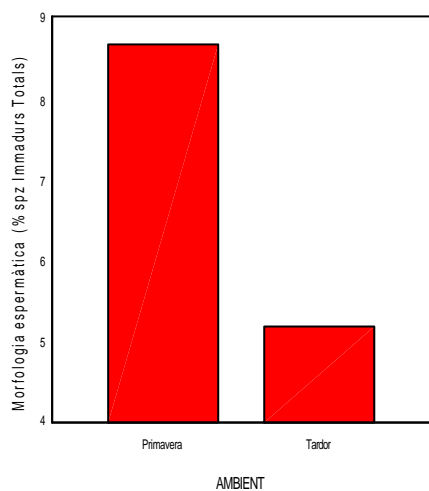
Gràfic 6.1. Resistència osmòtica dels acrosomes en medi isotònic dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,5580$).



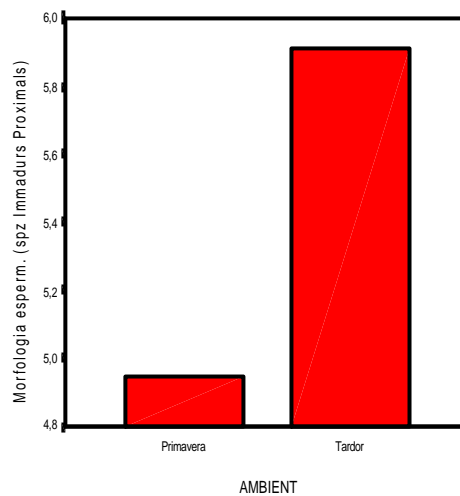
Gràfic 6.2. Resistència osmòtica dels acrosomes en medi hipotònic dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P<0,0001$).



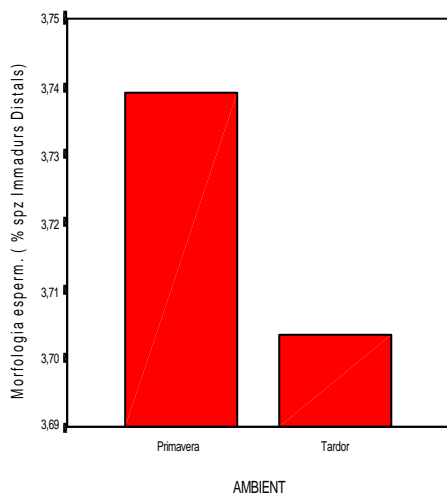
Gràfic 7.1. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides madurs dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,1740$).



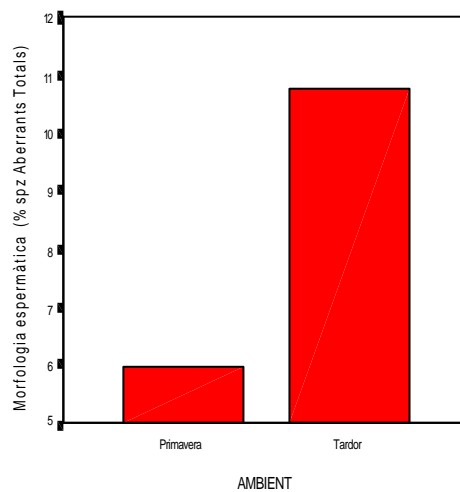
Gràfic 7.2. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides immadurs dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,0700$)



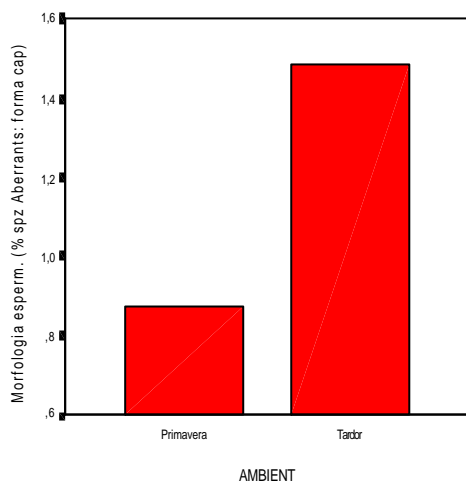
Gràfic 7.2.1. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides immadurs amb gota proximal dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,6320$).



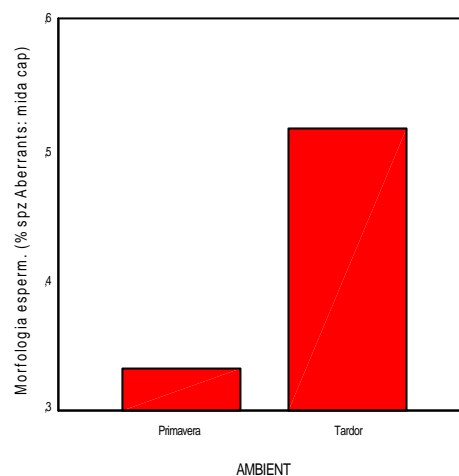
Gràfic 7.2.2. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides immadurs amb gota distal dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,9000$).



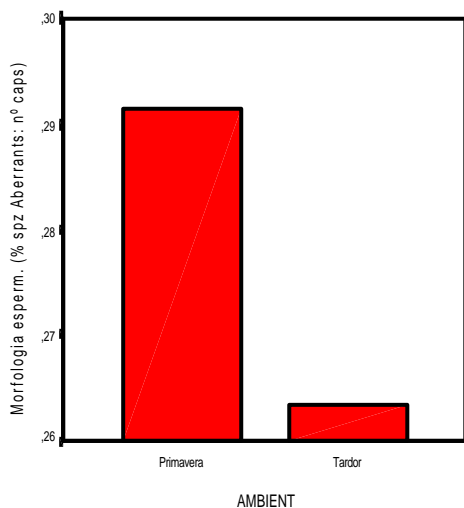
Gràfic 7.3. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides aberrants dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,4330$).



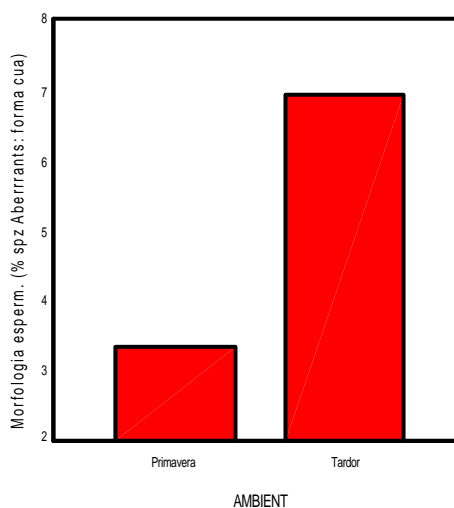
Gràfic 7.3.1. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides amb anomalies en la forma del cap dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,0010$).



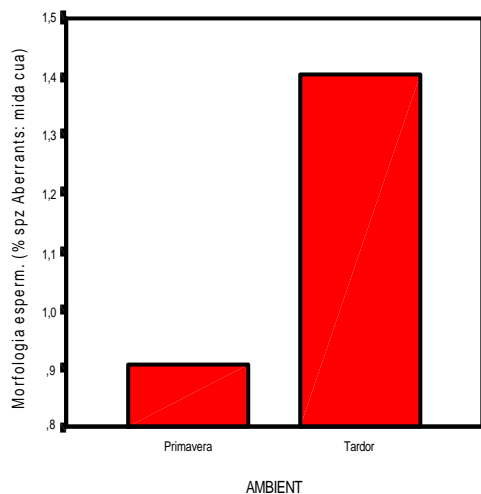
Gràfic 7.3.2. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides amb anomalies en la mida del cap dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,0330$).



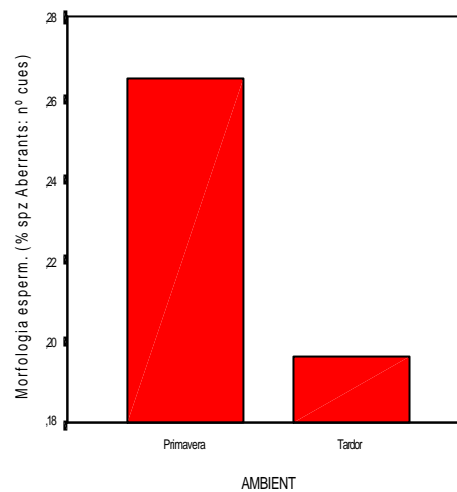
Gràfic 7.3.3. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,9000$).



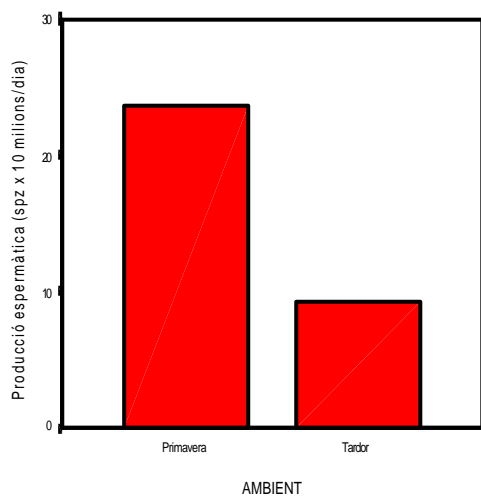
Gràfic 7.3.4. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,0760$).



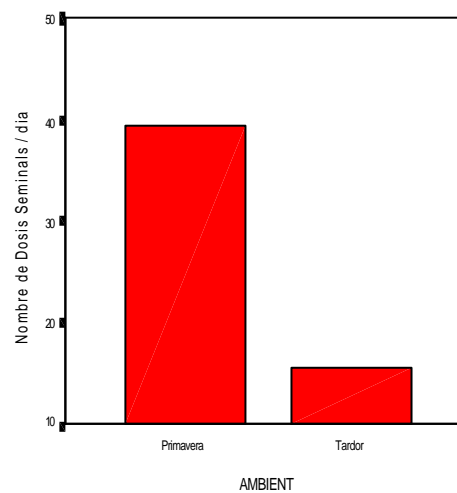
Gràfic 7.3.5. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,0030$).



Gràfic 7.3.6. *Morfologia espermàtica.* Espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P=0,0420$).



Gràfic 8. Producció espermàtica dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P<0,0001$).



Gràfic 9. Nombre de dosis seminals per ejaculat dels mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor ($P<0,0001$).

DISCUSSIÓ

La inseminació artificial (IA) ha esdevingut un dels elements clau de la indústria porcina (Colembrander i Kemp, 1990; Ciereszko i col., 2000). A fi d'obtenir el nombre màxim de dosis seminals per a la inseminació de les femelles, en els programes d'IA s'utilitzen mascles amb una elevada qualitat seminal, sobretot pel que fa al volum ejaculat i la concentració espermàtica (Colembrander i Kemp, 1990; Ciereszko i col., 2000). De tota manera, la producció espermàtica d'aquests mascles no és constant sinó que pot variar un 25-30% al llarg de l'any, fet que obliga als centres d'IA a mantenir un nombre adicional de sementals per tal de compensar aquestes fluctuacions (Claus i col., 1985; Colembrander i Kemp, 1990). Així doncs, el coneixement dels factors ambientals que afecten la qualitat del semen dels mascles porcins és bàsic a fi de millorar l'eficiència dels centres d'IA (Ciereszko i col., 2000).

El fotoperíode és un dels factors ambientals que incideixen de forma més rellevant en la funció reproductora del mascle porcí (Mauget, 1982; Buxadé, 1984; Claus i Weiler, 1985; Chemineau i col., 1991, 1993; Love i col., 1993; Prunier i col., 1994; Dial i col., 1997; Levine, 1999; Sancho i col., 1999; Tast i col., 2001; Yellon i Tran, 2002). De totes maneres, existeixen grans controvèrsies pel que fa

als seus efectes concrets i, probablement, aquests varien en funció de les característiques fisiològiques inherents al propi animal i d'altres característiques ambientals i de confinament (Dufour i col., 1984; Skinner i col., 1999; Ciereszko i col., 2000).

El porc domèstic, malgrat no ser una espècie reproductora estacional, assoleix els nivells màxims de qualitat espermàtica a les estacions de nits llargues i baixes temperatures, que a la nostra latitud es donen a finals de la tardor, a l'hivern i a principis de la primavera (Mauget, 1982; Claus i Weiler, 1985; Chemineau i col., 1991, 1993; Love i col., 1993; Levine, 1999; Andersen i col., 2001; Ben Saad i col., 2002). Aquest patró reproductiu coincideix amb el del seu ancestre, el porc senglar, una espècie reproductora de dia curt amb època d'aparellament entre els mesos d'octubre i març (Mauget, 1982; Dial i col., 1997; Skinner i col., 1999; Tast i col., 2001).

A finals de la primavera i començaments de l'estiu, amb l'arribada de les fotofases llargues i les temperatures elevades, s'observa un descens significatiu de la qualitat del semen i la capacitat fecundant del mascle porcí (Prunier i col., 1994; Andersson i col., 1998; Ciereszko i col., 2000). Les femelles, d'altra banda, també són susceptibles a aquests canvis en la durada del fotoperíode produint-se un descens de la taxa d'ovulació durant els mesos d'estiu (Clauis i Weiler, 1985; Chemineau i col., 1999; Peltoniemi i col., 1999). Així doncs, en els mesos d'estiu es produeix una sinèrgia d'efectes que repercuteix de forma negativa en el rendiment econòmic dels centres destinats a IA i també en els centres de multiplicació i selecció porcina (Buxadé, 1984; Love i col., 1993).

En el present treball, tot i que el volum seminal no difereix entre tractaments, el pH del semen és significativament superior a la tardor que a la primavera. De totes maneres, els valors de volum i pH seminal obtinguts en condicions de primavera i tardor es troben dins del rang considerat com a normal a l'espècie porcina (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Garner i Hafez, 1986; Setchell, 1991; Pinart i col., 1999b; Ciereszko i col., 2000). Aquests resultats coincideixen amb els

descrits per Cameron (1985) però estan en contradicció amb els aportats per Trudeau i Sanford (1986) i Setchell (1991) que afirmen que el volum de l'ejaculat varia en funció de la temperatura i el fotoperíode. Segons Ciereszko i col. (2000) aquestes divergències en els resultat obtinguts entre els diferents autors són degudes a que l'efecte del fotoperíode sobre el volum del semen varia de forma significativa segons la raça. El volum i el pH de l'ejaculat depenen, fonamentalment, de l'activitat secretora de la pròstata, les vesícules seminals i les glàndues de Cowper (Gopalkrishnan i col., 1992; Bartov i col., 1993; Ciereszko i col., 2000); així doncs, els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que el fotoperíode, per si sol, té poc efecte sobre l'activitat de les glàndules sexuals accessòries.

En condicions ambientals de tardor, la concentració i producció espermàtiques dels mascles són similars a les descrites en mascles porcins sans per molts autors (Martín, 1982; Buxadé, 1984; Briz, 1994; Bonet i col., 1995; Briz i col., 1995; Pinart i col., 1999b). En condicions ambientals de primavera, en canvi, el valor d'aquests paràmetres es duplica. Brandt i Diekman (1985), treballant amb mascles reproductors porcins adults, no van trobar una correlació positiva entre la fotofase i la producció d'espermatozoides, per bé que Ciereszko i col. (2000) van observar que a les regions de clima temperat la concentració espermàtica dels mascles porcins és màxima entre els mesos de març i maig, i mínima entre setembre i gener. Weiler i col. (1986) van detectar un increment del nombre total d'espermatozoides a l'ejaculat, de la libido i de la producció de testosterona i estrògens en mascles adults sotmesos a un règim invers d'hores de llum, és a dir, un increment d'hores de llum a la tardor i una reducció d'hores de llum a la primavera. En rates (Rocha i col., 1999) i en ovelles (El-Alamy i col., 2001) s'ha descrit també un increment de la producció espermàtica associat a l'augment d'hores de llum.

A l'estiu i a començaments de la tardor les nits són més llargues i la síntesi i secreció de melatonina augmenta (Bronson i Heideman, 1994; Wiseman i col.,

1998) provocant una disminució dels nivells d'LH i FSH i, per tant, de l'activitat testicular en les espècies reproductores de dia llarg, mentre que a la primavera la disminució de la secreció de melatonina comportaria un augment de l'activitat testicular en aquestes espècies (Brandt i Diekman, 1986; Minton i col., 1989; Diekman i col., 1992). En el porc domèstic, espècie no estacional però que podria comportar-se reproductivament com una espècie de dia curt (Mauget, 1982; Aleandri i col., 1996), les variacions en la pauta de secreció de melatonina dependent de l'estació podrien explicar les diferències observades entre els tractaments de primavera i tardor en la producció espermàtica.

Pel que fa al nombre de dosis seminals proporcionades pels mascles, no existeixen dades sobre l'efecte de l'estació. De totes maneres, essent aquest un valor que depèn de la concentració espermàtica, també està influenciat per la durada de la fotofase (Ciereszko i col., 2000).

En els dos tractaments, la vitalitat i motilitat espermàtiques mostren valors normals dins l'espècie porcina (Haupt, 1981; Wilson i Pond, 1981; Martín, 1982; Buxadé, 1984; Briz, 1994; Bonet i col., 1995; Briz i col., 1995, Pinart i col., 1999b), no observant-se diferències entre ells. Trudeau i Sanford (1986) tampoc troben diferències significatives en aquests paràmetres en mascles porcins adults sotmesos a diferents estacions. D'altra banda, estudis realitzats en cavalls indiquen que la motilitat és l'únic paràmetre seminal que es veu afectat per les condicions ambientals de llum i temperatura (Hoffmann i Landeck, 1999). En toros tampoc s'observen diferències significatives en la motilitat i la vitalitat dels espermatozoides segons el règim d'hores de llum (Chacón i col., 2002). Les principals causes de disminució de la motilitat i la vitalitat espermàtiques són: (1) una espermatogènesi defectuosa que es manifesta en anomalies estructurals de l'espermatozoide (Gopalkrishnan i col., 1995; Mundy i col., 1995), (2) alteracions en l'activitat de l'epiteli epididimari que provoquen canvis en el balanç iònic i proteic del fluid epididimari i interfereixen en la maduració de l'espermatozoide al llarg del conducte (Haidl i col., 1993; Yeung i col., 1993), o

(3) alteracions en l'activitat de les glàndules sexuals accessòries que poden provocar canvis en l'osmolaritat del semen (Gopalkrishnan i col., 1992). Els resultats obtinguts indiquen que el fotoperíode estacional no afecta el procés de diferenciació dels espermatozoides, ni a nivell testicular ni a nivell epididimari. La resistència osmòtica dels acrosomes en els tractaments de primavera i tardor es manté en uns nivells normals (Shilling i Vengust, 1987; Briz, 1994; Bonet i col., 1995, Briz i col., 1995), tot i que en condicions de tardor la resistència en medi hipotònic és un 10% inferior. Segons Ciereszko i col. (2000) i Pérez-Llano i col. (2001) la resistència osmòtica dels acrosomes és un paràmetre que varia segons l'estació de l'any, essent màxima a la tardor. Probablement aquestes diferències en els resultats obtinguts són degudes al mètode emprat per a l'avaluació de la resistència osmòtica dels acrosomes o a diferències en les condicions de confinament dels mascles. En qualsevol cas, aquestes diferències estacionals reflecteixen lleugeres variacions en el procés de diferenciació de la membrana acrosòmica al llarg de l'espermioogènesi i/o la maduració epididimària (Zamboni, 1992; Briz i col., 1995, 1996; Ciereszko i col., 2000). Els resultats obtinguts en aquest estudi indiquen que en condicions de tardor la membrana acrosòmica dels espermatozoides esdevé més sensible al medi que en condicions de primavera.

La morfologia espermàtica no difereix entre primavera i tardor. De totes maneres, en els mascles exposats a condicions de primavera i, sobretot, en els mascles exposats a condicions de tardor la freqüència d'espermatozoides immadurs i d'espermatozoides aberrants es troba per sobre dels valors considerats com a normals a l'espècie porcina (Martín, 1982; Briz i col., 1995; Pinart i col., 1999b; Bonet i col., 1995, 2000). La presència d'espermatozoides immadurs a l'ejaculat és conseqüència d'anomalies en el procés d'expulsió de la gota citoplasmàtica al llarg del conducte epididimari (Briz i col., 1995, 1996). Així doncs, en condicions de primavera i tardor sembla que es produeixen alteracions en aquest procés; no obstant, per conèixer amb exactitud els efectes del

fotoperíode sobre la maduració epididimària dels espermatozoides s'hauria de completar l'estudi amb l'anàlisi d'aquest paràmetre en condicions d'hivern i estiu.

Les aberracions espermàtiques poden tenir un origen testicular o epididimari. Les anomalies testiculars o primàries es desenvolupen durant l'espermatogènesi i l'espermioogènesi, mentre que les anomalies secundàries s'originen al llarg del conducte epididimari com a conseqüència d'alteracions en el procés de maduració dels espermatozoides (Briz i col., 1995, 1996). Així doncs, l'estudi detallat de les malformacions espermàtiques de l'ejaculat és un bon indicador de l'activitat del testicle i de l'epidídim (Buxadé, 1984; Bonet i col., 1991; Briz i col., 1995, 1996; Pinart i col., 1999b). En els mascles exposats a condicions de tardor es produeix un augment de la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma i la mida del cap i en la mida de la cua respecte dels mascles exposats a condicions de primavera. Aquestes anomalies cefàliques poden originar-se en el testicle degut a alteracions en el procés de condensació de la cromatina nuclear, o bé en l'epidídim com a resultat d'anomalies en la maduració del nucli i l'acrosoma (Barth i Oko, 1989; Zamboni, 1992; Briz i col., 1995, 1996). Les anomalies en la mida de la cua s'originen en el testicle com a conseqüència d'alteracions en el desenvolupament d'una o vàries regions del flagel (Zamboni, 1992; Haidl i col., 1993; Briz i col., 1995, 1996). Barth i Oko (1989) afirmen que la manca de llum altera tots els estadis de la morfogènesi espermàtica (espermatogènesi, espermioogènesi i maduració epididimària); aquest fet estaria associat a l'augment de la freqüència de malformacions espermàtiques en mascles porcins postpuberals sotmesos a fotofases curtes.

Així doncs, els resultats obtinguts en el present estudi demostren que es produeix una disminució de la qualitat seminal dels mascles porcins mantinguts en condicions de tardor en comparació amb els mascles mantinguts en condicions de primavera com a conseqüència de: (1) la disminució de la concentració i la producció espermàtiques, (2) l'increment del pH del semen, (3)

la disminució de la resistència osmòtica de l'acrosoma i (4) l'augment de la freqüència d'espermatozoides immadurs i espermatozoides aberrants. Sembla doncs, que a la tardor té lloc una disminució de l'activitat testicular, canvis en l'activitat de les glàndules sexuals accessòries i disfuncions en el procés de diferenciació testicular i epididimària dels espermatozoides, especialment de l'acrosoma.

Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts per molts autors, els quals descriuen un descens de la qualitat del semen just després de l'estiu (Mauget, 1982; Buxadé, 1984; Brandt i Diekman, 1985; Claus i Weiler, 1985; Trudeau i Sanford, 1986; Minton i col., 1989; Chemineau i col., 1991, 1993; Love i col., 1993; Prunier i col., 1994; Dial i col., 1997; Levine, 1999; Tast i col., 2001; Yellon, 2002). Aquest descens és conseqüència de les elevades temperatures estivals que es manifesten a l'ejaculat un mes després del seu increment, quan s'ha completat la corresponent ona testicular (Trudeau i Sanford, 1986; Minton i col., 1989; Fournier-Delpech i Thibault, 1993; Love i col., 1993). De totes maneres Trudeau i Sanford (1986) van observar que la disminució estival de la qualitat del semen precedia a l'arribada de les altes temperatures i, per tant, podria ser deguda a canvis endocrins induïts pel fotoperíode més que no pas a la temperatura. A més, Paradell (1995) afirma que a la primavera la qualitat seminal s'altera un més després de l'increment de la fotofase, és a dir, abans de l'augment de la temperatura estival; aquest fet demostra la importància del fotoperíode com un factor independent de la temperatura que altera la qualitat espermàtica. Les variacions estacionals de la qualitat i el poder fecundant del semen i, fins i tot, de la libido del mascle porcí han estat, també, confirmades en els escassos estudis realitzats mantenint constant la temperatura i modificant únicament el fotoperíode (Claus i Weiler, 1985; Sancho i col., 1999; Tast i col., 2001; Yellon, 2002).

Les causes de les fluctuacions estacionals de la qualitat del semen són encara desconegudes, per bé que molt probablement estan regulades per mecanismes

hormonals controlats pel fotoperíode (Claus i Weiler, 1985a, 1985b). De totes maneres, existeixen molts altres factors que poden modificar la qualitat del semen dels mascles porcíns, com l'augment de la temperatura, el ritme d'extraccions de semen i l'edat (Bonet i col., 1991; Strzezek i col., 1995; Pinart i col., 1999b). No obstant, en el nostre estudi la freqüència d'obtenció del semen no afecta la qualitat seminal (Strzezek i col., 1995; Ciereszko i col., 2000), mentre que l'edat i el règim nutricional són els mateixos per a tots els mascles. Per aquest motiu, les dades obtingudes en el present treball reflecteixen les diferències estacionals de la qualitat del semen dels mascles postpuberals entre la primavera i la tardor. De totes maneres, per tal de caracteritzar la repetitivitat dels canvis estacionals de la qualitat del semen seria convenient repetir els tractaments durant varis anys i, a més, incloure les estacions d'hivern i estiu.

Finalment, les dades aportades en aquest treball s'haurien de complementar amb altres estudis en mascles porcíns prepuberals, donat que existeixen grans controvèrsies sobre l'efecte del fotoperíode en la pubertat. Mahone i col. (1979) troben que l'augment de les hores diàries de llum provoca una acceleració de la pubertat, mentre que Berger i col. (1980) observen que els suplementes de llum no afecten la qualitat del semen de mascles joves. Malgrat aquests resultats contradictoris, és palès l'efecte del fotoperíode sobre la funció reproductora del mascle porcí, tal i com succeeix al seu ancestre.

Capítol 2

**Qualitat del semen i fertilitat de mascles
exposats a condicions experimentals de
24, 12 i 0 hores de llum artificial**

RESULTATS

Per a cada tractament experimental, donat que no existeixen diferències significatives entre els mascles, s'ha calculat el valor mig dels paràmetres seminals emprant les dades dels 10 mascles; els resultats s'expressen com la mitjana \pm SD ($n=10$).

1. Estudi comparatiu del volum seminal

1.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

El volum seminal dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial és de $210,50 \pm 60,04$ ml al primer mes, de $226,56 \pm 61,96$ ml al segon mes i de $187,08 \pm 60,43$ al tercer mes (Taula 1, Gràfic).

Així doncs, no s'observen diferències significatives en el volum del semen entre el primer i el segon mes de tractament ($P=0,2950$), per bé que en el tercer més es produeix un descens significatiu ($P<0,0001$).

1.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

El volum seminal dels mascles exposats a 12 hores de llum artificial ha estat de $162,95 \pm 45,84$ ml, $162,10 \pm 47,13$ ml i $169,44 \pm 48,181$ ml en el primer, el segon i el tercer mes d'experimentació, respectivament (Taula 1, Gràfic 1).

Per tant, no s'observen diferències significatives en el volum seminal al llarg dels tres mesos de tractament experimental ($P=0,5840$).

1.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

En els mascles mantinguts a 0 hores de llum artificial el volum seminal ha estat de $138,16 \pm 45,54$ ml al cap d'un mes de tractament, de $152,69 \pm 67,00$ ml al cap de dos mesos i de $159,91 \pm 60,60$ ml al cap de tres mesos (Taula 1, Gràfic 1).

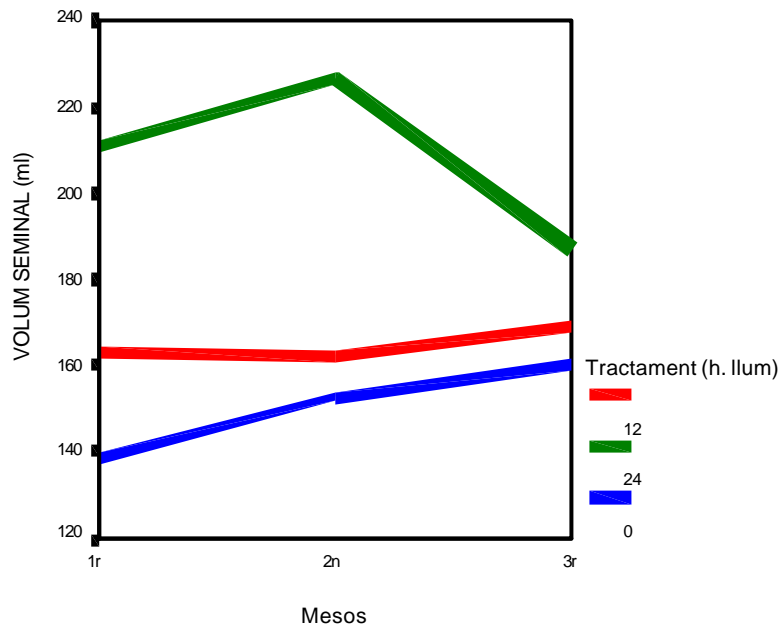
No existeixen diferències significatives en el volum seminal durant els tres mesos de tractament ($P=0,0900$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	$210,50 \pm 60,04$ *	$226,56 \pm 61,96$ *	$187,08 \pm 60,43$ ¹ *
12	$162,95 \pm 45,84$	$162,10 \pm 47,13$	$169,44 \pm 48,18$
0	$138,16 \pm 45,54$ [∇]	$152,69 \pm 67,00$ [∇]	$159,91 \pm 60,60$ [∇]

Taula 1. Volum seminal en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en ml \pm SD ($n=10$).

¹ Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 1. Volum seminal al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

1.4. Comparacions entre grups

Al llarg dels tres mesos d'experimentació el volum seminal dels mascles mantinguts a 24 hores de llum artificial és significativament superior al dels mascles mantinguts a 12 hores de llum ($P < 0,0001$). En canvi, no s'han observat diferències significatives entre els mascles exposats a 0 hores de llum artificial i els mascles control al primer ($P = 0,0610$), segon ($P = 0,5930$) i tercer ($P = 0,4900$) mes de tractament.

En comparar els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial s'observa que el volum del semen és significativament inferior en els mascles mantinguts a llum contínua al llarg dels tres mesos d'experimentació ($P < 0,0001$).

2. Estudi comparatiu del pH seminal

2.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles exposats a 24 hores de llum artificial el pH del semen ha estat de $7,11 \pm 0,19$ unitats al primer mes, de $7,24 \pm 0,19$ unitats al segon mes i de $7,35 \pm 0,17$ unitats al tercer mes (Taula 2, Gràfic 2).

Així doncs, s'observa un augment significatiu del pH seminal entre el primer i segon mes ($P < 0,0001$) i entre el segon i tercer mes ($P = 0,0010$) de tractament.

2.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

El pH seminal dels mascles exposats a 12 hores de llum artificial en el primer mes, el segon mes i el tercer mes és de $7,39 \pm 0,13$, $7,37 \pm 0,18$ i $7,20 \pm 0,19$ unitats respectivament (Taula 2, Gràfic 2).

Entre el primer i segon mes de tractament no s'observen diferències significatives ($P = 0,8120$), però en el tercer mes es produeix un descens significatiu del pH seminal ($P < 0,0001$).

2.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

Al llarg del tractament experimental, el pH del semen dels mascles exposats a 0 hores de llum artificial és de $7,27 \pm 0,21$, $7,44 \pm 0,24$ i $7,34 \pm 0,20$ unitats (Taula 2, Gràfic 2).

Així doncs, es produeix un augment significatiu del pH en el segon mes ($P < 0,0001$) i un descens significatiu en el tercer mes ($P = 0,0060$) de tractament.

Resultats

Malgrat tot, no s'observen diferències significatives entre el primer i el tercer mes de tractament en el pH del semen ($P=0,1650$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	7,11 ± 0,19 *	7,24 ± 0,19 ^{1*}	7,35 ± 0,18 ^{2,3*}
12	7,39 ± 0,13	7,37 ± 0,18	7,20 ± 0,19 ^{2,3}
0	7,27 ± 0,21 ^{*∇}	7,44 ± 0,24 ^{1*∇}	7,34 ± 0,20 ^{2*}

Taula 2. pH seminal en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en unitats de pH ± SD ($n=10$).

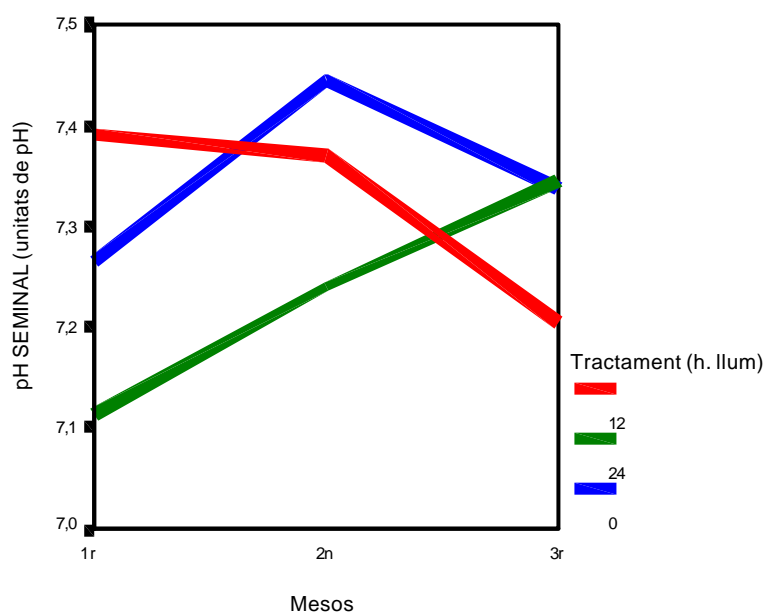
¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ³Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.

2.4. Comparacions entre grups

En el primer mes de tractament el pH del semen dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial ($P<0,0001$) i dels mascles exposats a 0 hores de llum ($P=0,0050$) és significativament inferior al dels mascles control. En el segon mes, tot i que el pH dels mascles mantinguts a 24 hores de llum artificial és significativament inferior ($P<0,0001$), el pH dels mascles exposats a foscor absoluta és significativament superior ($P=0,0280$) al dels mascles control. Finalment, en el tercer mes d'experimentació el pH dels mascles control és significativament inferior al dels mascles exposats a 24 hores ($P<0,0001$) i 0 hores ($P<0,0001$) de llum artificial.

Tot i que en el primer ($P<0,0001$) i el segon ($P<0,0001$) mes d'experimentació el pH del semen és significativament inferior en els mascles mantinguts a llum contínua, en el tercer mes, no s'han observat diferències en el valor d'aquest paràmetre entre els mascles exposats a 24 i 0 hores de llum ($P=0,9630$).



Gràfic 2. pH seminal al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

3. Estudi comparatiu de la concentració espermàtica

3.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

La concentració espermàtica dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial és de 201.502 ± 112.762 spz x 10^6 /ml al primer mes, de 204.906 ± 67.028 spz x

Resultats

10⁶/ml al segon mes i de 242.591 ± 83.168 spz x 10⁶/ml al tercer mes de tractament (Taula 3, Gràfic 3).

Entre el primer i el segon mes no existeixen diferències significatives ($P=0,9740$), però en el tercer mes de tractament es produeix un increment significatiu de la concentració espermàtica ($P= 0,0280$).

3.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

Al llarg dels tres mesos d'exposició dels mascles a 12 hores de llum artificial la concentració espermàtica ha estat de 716.403 ± 163.801 spz x 10⁶/ml, de 747.154 ± 183.346 spz x 10⁶/ml i de 604.158 ± 213.742 spz x 10⁶/ml (Taula 3, Gràfic 3).

Entre el primer i el segon mes de tractament no existeixen diferències en la concentració espermàtica ($P=0,6950$), però s'observa un descens significatiu en el tercer mes ($P<0,0001$).

3.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

La concentració espermàtica dels mascles exposats a 0 hores de llum artificial durant el primer, el segon i el tercer mes de tractament ha estat, respectivament, de 433.265 ± 168.980 spz x 10⁶/ml, de 479.391 ± 187.941 spz x 10⁶/ml i de 667.521 ± 262.355 spz x 10⁶/ml (Taula 3, Gràfic 3).

No existeixen diferències significatives entre el primer i el segon mes de tractament ($P=0,4870$), per bé que la concentració espermàtica s'incrementa de forma significativa en el tercer mes d'exposició dels mascles a foscor absoluta ($P<0,0001$).

3.4. Comparacions entre grups

Al llarg dels tractaments experimentals, la concentració espermàtica dels mascles mantinguts a 24 hores de llum artificial ha estat significativament inferior a la dels mascles mantinguts a 12 hores ($P<0,0001$) i a 0 hores ($P<0,0001$) de llum artificial.

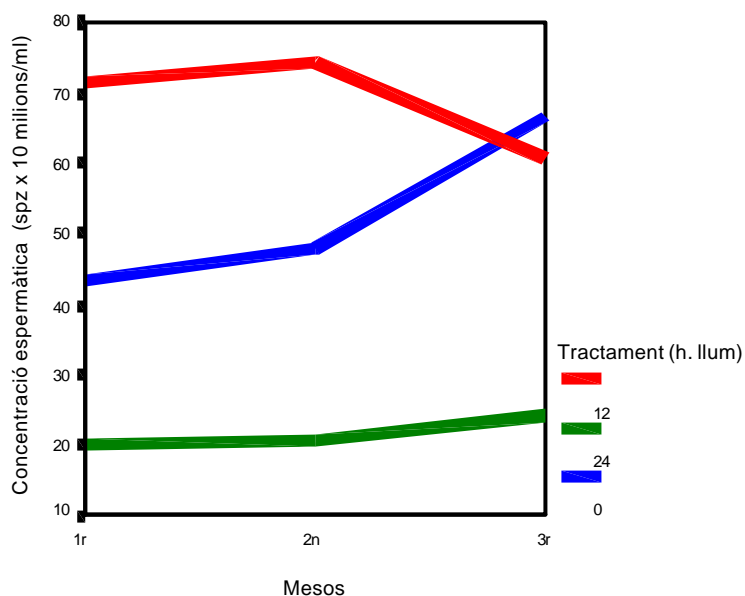
En el primer ($P<0,0001$) i segon ($P<0,0001$) mes d'exposició dels mascles a condicions de foscor absoluta la concentració espermàtica ha estat significativament inferior a la dels mascles control, no observant-se diferències entre ambdós grups en el tercer mes de tractament ($P=0,1010$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	201.502 ± 112.762 *	204.906 ± 67.028 *	242.591 ± 83.168 ^{1,2*}
12	716.403 ± 163.801	747.154 ± 183.346	604.158 ± 213.742 ^{1,2}
0	433.265 ± 168.980 ^{*∇}	479.391 ± 187.941 ^{*∇}	667.521 ± 262.355 ^{1,2∇}

Taula 3. Concentració espermàtica en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en spz x 10⁶/ml ± SD ($n=10$).

¹Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ²Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 3. Concentració espermàtica al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

4. Estudi comparatiu de la vitalitat espermàtica

4.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides vius dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial és de $83,53 \pm 14,13 \%$, $85,62 \pm 14,14 \%$ i $88,90 \pm 13,15 \%$ al primer, segon i tercer mes de tractament (Taula 4, Gràfic 4).

No s'observen diferències significatives al llarg dels mesos d'experimentació en la vitalitat espermàtica dels ejaculats ($P=0,0850$).

4.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

Al llarg del fotoperíode 2, la vitalitat espermàtica ha estat de $92,54 \pm 6,16\%$ al primer mes, de $92,55 \pm 2,92\%$ al segon mes i de $93,51 \pm 3,09\%$ al tercer mes (Taula 4, Gràfic 4).

El percentatge d'espermatozoides vius no difereix de forma significativa entre els mesos de tractament ($P=0,2000$).

4.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

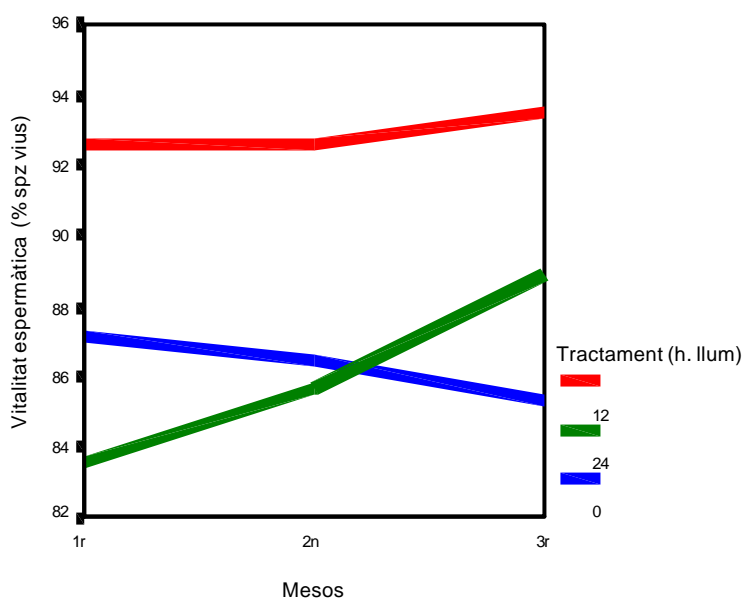
La vitalitat espermàtica dels mascles exposats a 0 hores de llum artificial és de $87,19 \pm 9,31\%$, $86,48 \pm 8,98\%$ i $85,31 \pm 9,08\%$ en cadascun dels mesos de tractament (Taula 4, Gràfic 4).

Així doncs, al llarg del fotoperíode no s'observen diferències significatives de la vitalitat espermàtica dels ejaculats ($P=0,4510$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	$83,53 \pm 14,13$ *	$85,62 \pm 14,14$ *	$88,90 \pm 13,15$ *
12	$92,54 \pm 6,16$	$92,55 \pm 2,92$	$93,51 \pm 3,09$
0	$87,19 \pm 9,31$ *	$86,48 \pm 8,98$ *	$85,31 \pm 9,08$ * [∇]

Taula 4. Vitalitat espermàtica en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % d'espermatozoides vius \pm SD ($n=10$).

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 4. Vitalitat espermàtica al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

4.4. Comparacions entre grups

La vitalitat espermàtica dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial ha estat significativament inferior a la dels mascles exposats a 12 hores de llum al llarg dels tres mesos d'experimentació ($P < 0,0001$). Malgrat que la vitalitat espermàtica dels mascles exposats a 0 hores de llum artificial en el primer mes de tractament no difereix dels mascles control ($P = 0,1010$), en el segon ($P < 0,0001$) i el tercer ($P < 0,0001$) mes és significativament inferior.

No s'observen diferències significatives entre els mascles exposats a 24 hores i 0 hores de llum artificial en el primer ($P = 0,2120$) i el segon ($P = 0,8550$) mes de tractament, però en el tercer mes ($P = 0,0270$) la vitalitat és significativament inferior en els mascles mantinguts a fosc absoluta.

5. Estudi comparatiu de la motilitat espermàtica

5.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els tres mesos de tractament, la freqüència d'espermatozoides mòbils dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial ha estat de $98,52 \pm 0,77\%$, $98,29 \pm 0,79\%$ i $98,42 \pm 0,71\%$ (Taula 5, Gràfic 5).

No existeixen diferències significatives en la motilitat espermàtica al llarg dels mesos d'experimentació ($P=0,1950$).

5.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

La motilitat espermàtica dels mascles mantinguts a 12 hores de llum artificial ha estat de $98,42 \pm 0,52\%$, $98,58 \pm 0,50\%$ i $98,10 \pm 0,87\%$ en el primer, el segon i el tercer mes d'exposició, respectivament (Taula 5, Gràfic 5).

En el tercer mes de tractament s'observa un descens significatiu de la freqüència d'espermatozoides mòbils respecte del primer ($P=0,0430$) i el segon mes ($P<0,0001$).

5.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

La motilitat espermàtica dels mascles del fotoperíode 3 ha estat de $98,29 \pm 0,78\%$ al primer mes, de $97,79 \pm 0,86\%$ al segon mes i de $97,70 \pm 0,99\%$ al tercer mes (Taula 5, Gràfic 5).

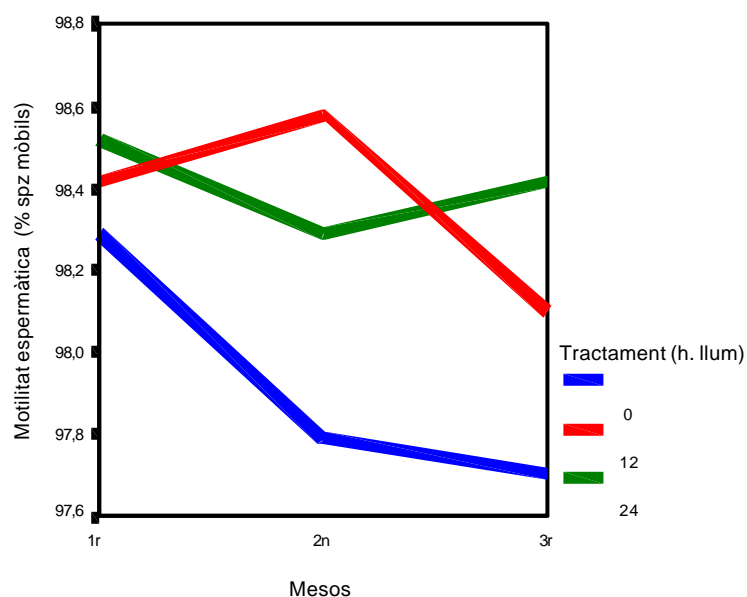
Així doncs, en el segon mes de tractament s'observa una disminució significativa de la freqüència d'espermatozoides mòbils ($P=0,0060$), assolint un valor que es manté estable en el tercer mes ($P<0,0001$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	98,52 ± 0,77	98,29 ± 0,79 *	98,42 ± 0,71
12	98,42 ± 0,52	98,58 ± 0,50 ²	98,10 ± 0,87 ^{2,3}
0	98,29 ± 0,78	97,79 ± 0,86 ^{1*∇}	97,70 ± 0,99 ^{3*∇}

Taula 5. Motilitat espermàtica en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % d'espermatozoides mòbils ± SD (n=10).

¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ³Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). ∇Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 5. Motilitat espermàtica al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

5.4. Comparacions entre grups

En el primer mes de tractament no s'observen diferències entre els grups en la freqüència d'espermatozoides mòbils ($P=0,2420$). De totes maneres, a partir del segon mes es produeix, respecte del grup control, un descens significatiu de la motilitat espermàtica en els mascles exposats a 0 hores ($P<0,0001$) de llum artificial, i un augment significatiu en els mascles exposats a 24 hores de llum artificial ($P=0,0230$). En el tercer mes d'experimentació la motilitat espermàtica augmenta significativament en els mascles exposats a foscor absoluta ($P=0,0060$) respecte dels mascles mantinguts en condicions de 12 hores de llum.

Tot i que no existeixen diferències significatives entre els mascles exposats a 24 hores i 0 hores de llum artificial en el primer mes ($P=0,2420$), s'observa un augment significatiu de la motilitat espermàtica en els mascles confinats a foscor absoluta en el segon ($P<0,0001$) i el tercer ($P<0,0001$) mes d'experimentació.

6. Estudi comparatiu de la resistència osmòtica dels acrosomes

6.1. Medi isotònic

6.1.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles mantinguts a 24 hores de llum artificial la resistència osmòtica dels acrosomes en medi isotònic és de $92,14 \pm 7,39\%$ al primer mes, de $94,20 \pm 8,37\%$ al segon mes i de $95,03 \pm 4,30\%$ al tercer mes (Taula 6.1, Gràfic 6.1).

Així doncs, no s'observen diferències significatives en la freqüència d'espermatozoides amb l'acrosoma resistent en medi isotònic al llarg dels mesos d'experimentació ($P=0,0600$).

6.1.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

En els tres mesos d'exposició dels mascles a 12 hores de llum artificial, la resistència osmòtica en medi isotònic ha estat de $95,63 \pm 3,00\%$, $95,73 \pm 2,09\%$ i $96,38 \pm 1,77\%$ respectivament (Taula 6.1, Gràfic 6.1).

Per tant, no s'observen canvis significatius en la resistència osmòtica al llarg del tractament experimental ($P=0,1780$).

6.1.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb l'acrosoma resistent en medi isotònic en els mascles exposats a 0 hores de llum artificial ha estat en el primer mes, el segon mes i el tercer mes de tractament de $89,11 \pm 7,02\%$, $89,91 \pm 6,58\%$ i $89,00 \pm 10,31\%$, respectivament (Taula 6.1, Gràfic 6.1).

Aquests valors al llarg dels tres mesos d'experimentació no són estadísticament diferents entre sí ($P=0,7480$).

6.1.4. Comparacions entre grups

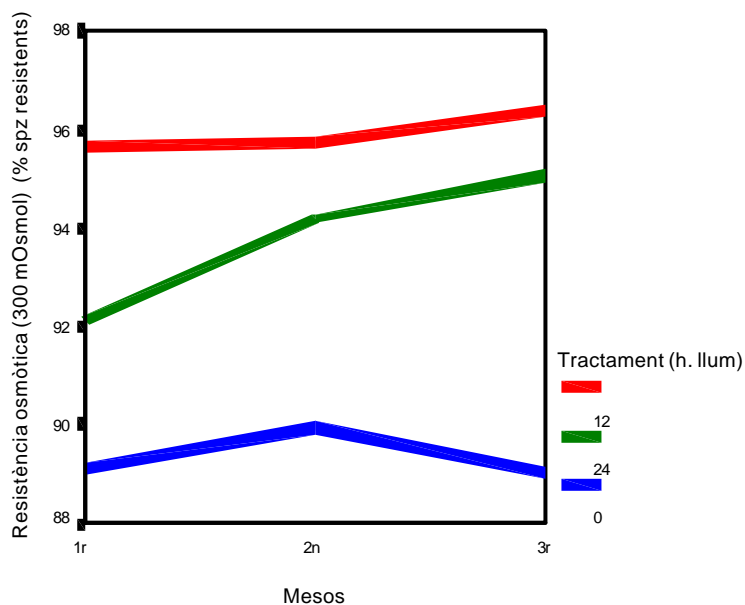
Al llarg de tot el tractament experimental, la resistència osmòtica dels acrosomes en medi isotònic dels mascles exposats a 24 hores de llum no difereix dels mascles control ($P=0,2500$), mentre que la resistència osmòtica dels mascles exposats a foscor absoluta és significativament inferior ($P<0,0001$).

En comparar els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial s'observa que no existeixen diferències significatives en el primer mes ($P=0,0640$), per bé que en el segon mes ($P<0,0001$) i el tercer mes ($P<0,0001$) la resistència osmòtica és significativament inferior en els mascles mantinguts a 0 hores de llum artificial.

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	92,14 ± 7,39	94,20 ± 8,37	95,03 ± 4,30
12	95,63 ± 3,00	95,73 ± 2,09	96,38 ± 1,77
0	89,11 ± 7,02 *	89,91 ± 6,58 * [∇]	89,00 ± 10,31 * [∇]

Taula 6.1. Resistència osmòtica dels acrosomes en medi isotònic en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % d'espermatozoides resistents ± SD ($n=10$).

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 6.1. Resistència osmòtica dels acrosomes en medi isotònic al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

6.2. Medi hipotònic

6.2.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

La resistència osmòtica dels acrosomes en medi hipotònic en mascles mantinguts a 24 hores de llum artificial és de $54,23 \pm 14,85\%$, de $64,54 \pm 15,23\%$ i de $67,14 \pm 15,15\%$ al primer, segon i tercer mes de tractament (Taula 6.2, Gràfic 6.2).

S'observa un increment significatiu de la resistència osmòtica entre el primer i segon mes ($P < 0,0001$), assolint un valor que es manté estable en el tercer mes de tractament ($P = 0,5170$).

6.2.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb l'acrosoma resistent al llarg del fotoperíode 2 ha estat de $67,00 \pm 7,97\%$, de $63,72 \pm 12,90\%$ i de $64,90 \pm 8,25\%$ respectivament (Taula 6.2, Gràfic 6.2).

La resistència osmòtica no difereix de forma significativa al llarg dels tres mesos d'exposició dels mascles a 12 hores de llum artificial.

6.2.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb l'acrosoma resistent en medi hipotònic ha estat de $55,70 \pm 12,98\%$ al primer mes, de $55,19 \pm 10,72\%$ al segon mes i de $55,55 \pm 12,60\%$ al tercer mes d'exposició dels mascles a 0 hores de llum artificial (Taula 6.2, Gràfic 6.2).

No existeixen diferències significatives en la resistència osmòtica dels acrosomes en medi hipotònic al llarg del fotoperíode 3 ($P = 0,9710$).

6.2.4. Comparacions entre grups

En el primer mes de tractament, la resistència osmòtica dels acrosomes en medi hipotònic en els mascles exposats a 24 i a 0 hores de llum artificial és significativament inferior a la dels mascles control ($P < 0,0001$). En el segon ($P = 0,2500$) i el tercer ($P = 0,4930$) mes d'experimentació la resistència osmòtica dels mascles exposats a 24 hores no difereix dels mascles control.

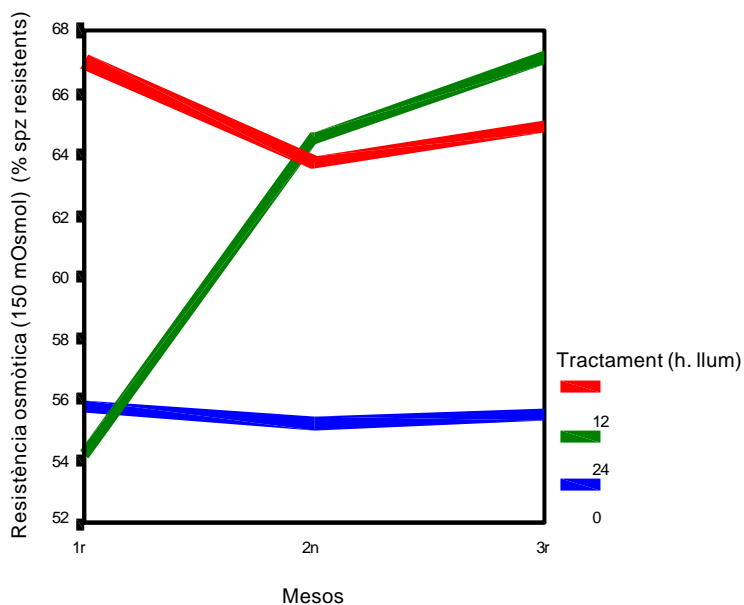
La resistència osmòtica dels mascles mantinguts a fosc absolut en el segon i tercer mes de tractament és significativament inferior a la dels mascles exposats a 12 hores ($P < 0,0001$) i dels mascles exposats a 24 hores ($P < 0,0001$) de llum artificial.

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	54,23 ± 14,85 *	64,54 ± 15,23 ¹	67,14 ± 15,15 ²
12	67,00 ± 7,97	63,72 ± 12,90	64,90 ± 8,25
0	55,70 ± 12,98 *	55,19 ± 10,72 ^{*∇}	55,55 ± 12,60 ^{*∇}

Taula 6.2. Resistència osmòtica dels acrosomes en medi hipotònic en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % d'espermatozoides resistents ± SD ($n=10$).

¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 6.2. Resistència osmòtica dels acrosomes en medi hipotònic al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7. Estudi comparatiu de la morfologia espermàtica

7.1. Espermatozoides madurs

7.1.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles mantinguts a 24 hores de llum artificial, la freqüència d'espermatozoides madurs és de $80,65 \pm 7,29\%$ al primer mes de tractament, de $83,50 \pm 4,89\%$ al segon mes i de $82,03 \pm 6,19\%$ al tercer mes (Taula 7.1, Gràfic 7.1). Així doncs, en el segon mes de tractament s'observa un increment significatiu de

la freqüència d'espermatozoides madurs ($P=0,0180$), assolint un valor que es manté estable en el tercer mes ($P=0,2570$).

7.1.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

En els tres mesos d'exposició a 12 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides madurs de l'ejaculat ha estat de $85,64 \pm 2,35\%$, de $85,76 \pm 9,50\%$ i de $88,00 \pm 1,93\%$ (Taula 7.1, Gràfic 7.1).

La freqüència d'espermatozoides madurs no difereix de forma significativa al llarg del fotoperíode 2 ($P>0,1320$).

7.1.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides madurs dels mascles mantinguts a 0 hores de llum artificial és de $84,05 \pm 3,01\%$, $84,43 \pm 9,30\%$ i $88,18 \pm 3,92\%$ al primer, segon i tercer mes d'exposició, respectivament (Taula 7.1, Gràfic 7.1).

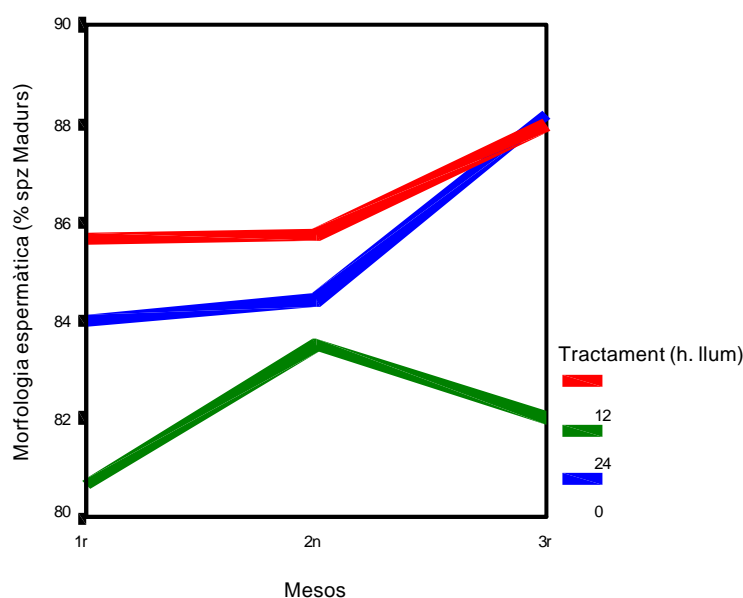
No existeixen diferències significatives entre el primer i el segon mes de tractament ($P=0,9370$) però en el tercer mes es produeix un increment significatiu de la freqüència d'espermatozoides madurs ($P<0,0001$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	80,65 ± 7,29 ^{*∇}	83,50 ± 4,89 ¹	82,03 ± 6,19 ^{*∇}
12	85,64 ± 2,35	85,76 ± 9,50	87,99 ± 1,93
0	84,04 ± 3,01	84,43 ± 9,30	88,18 ± 3,92 ^{2,3∇}

Taula 7.1. Frequència d'espermatozoides madurs en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com a mitjana en % ± SD (n=10).

¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ³ Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 7.1. Frequència d'espermatozoides madurs al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7.1.4. Comparacions entre grups

En el primer i el tercer mes de tractament la freqüència d'espermatozoides madurs dels mascles mantinguts a 24 hores de llum artificial és significativament inferior a la dels mascles mantinguts a 12 hores ($P < 0,0001$) i a 0 hores ($P < 0,0001$).

En canvi, no s'observen diferències significatives entre els mascles control i els mascles exposats a foscor absoluta en el primer ($P = 0,2780$), segon ($P = 0,5160$) i tercer ($P = 0,9490$) mes de tractament.

7.2. Espermatozoides immadurs

7.2.1. Gota citoplasmàtica proximal

7.2.1.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles exposats a 24 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal al llarg dels tres mesos ha estat de $6,09 \pm 1,69\%$, $6,33 \pm 1,57\%$ i $6,33 \pm 1,53\%$ respectivament (Taula 7.2.1, Gràfic 7.2.1).

Aquests valors obtinguts en el primer mes, el segon mes i el tercer mes de tractament no són estadísticament diferents entre sí ($P = 0,6700$).

7.2.1.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal en els mascles exposats a 12 hores de llum artificial és de $6,09 \pm 1,11\%$ en el primer mes, de $5,62$

Resultats

$\pm 1,42\%$ en el segon mes i de $4,95 \pm 1,05\%$ en el tercer mes (Taula 7.2.1, Gràfic 7.2.1).

Així doncs, es produeix un descens significatiu de la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal en el tercer mes de tractament ($P=0,0010$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	$6,09 \pm 1,69$	$6,33 \pm 1,57$ ^{1*∇}	$6,33 \pm 1,53$ ^{2*∇}
12	$6,09 \pm 1,11$	$5,62 \pm 1,42$	$4,95 \pm 1,05$ ^{2,3}
0	$6,30 \pm 1,09$	$5,62 \pm 1,68$ ¹	$2,98 \pm 1,16$ ^{2,3*}

Taula 7.2.1. Freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en $\% \pm SD$ ($n=10$).

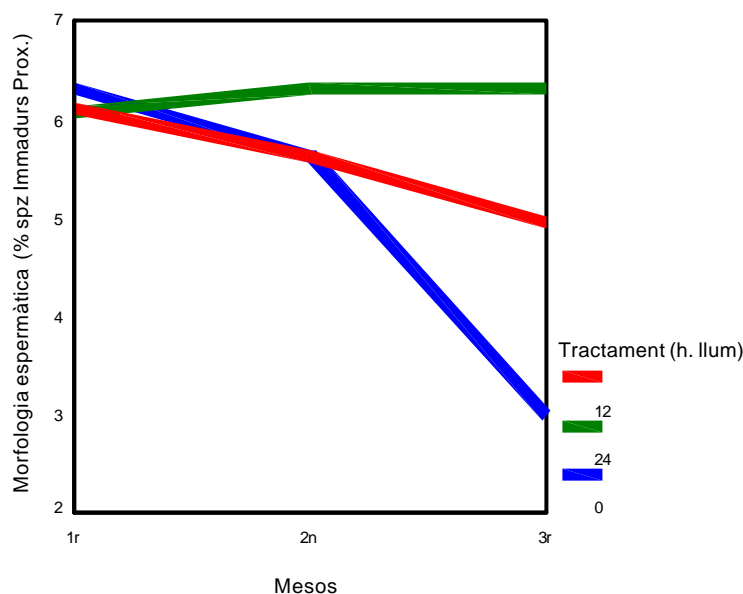
¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ³Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.

7.2.1.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

En els mascles exposats al fotoperíode 3 la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal és de $6,30 \pm 1,09\%$, de $5,62 \pm 1,68\%$ i de $2,98 \pm 1,16\%$ en cadascun dels mesos de tractament (Taula 7.2.1, Gràfic 7.2.1).

Es produeix, per tant, una reducció significativa de la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota citoplasmàtica proximal en el segon ($P=0,0140$) i en el tercer mes ($P<0,0001$) d'experimentació.



Gràfic 7.2.1. Freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7.2.1.4. Comparacions entre grups

Tot i que no s'observen diferències significatives en el primer mes ($P=0,9970$), la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal en el segon ($P=0,0050$) i el tercer ($P<0,0001$) mes és significativament superior en els mascles exposats a llum contínua que en els mascles control. La freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal en el primer ($P=0,7700$) i el segon ($P=0,9940$) mes de tractament de foscor absoluta no difereix dels mascles control, però és significativament inferior ($P<0,0001$) en el tercer mes.

En comparar els mascles exposats a 24 i 0 hores de llum artificial, no s'observen diferències en el primer mes ($P=0,7019$), però en el segon ($P=0,0070$) i el tercer ($P<0,0001$) mes la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota proximal és significativament superior en els mascles exposats a llum contínua.

7.2.2. Gota citoplasmàtica distal

7.2.2.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles exposats a 24 hores de llum artificial, la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota citoplasmàtica distal ha estat de $4,27 \pm 1,76\%$, $3,30 \pm 1,24\%$, i $3,91 \pm 1,38\%$ al primer, segon i tercer mes respectivament (Taula 7.2.2, Gràfic 7.2.2).

Així doncs, es produeix un descens significatiu de la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal en el segon mes de tractament ($P<0,0001$), i un increment significatiu en el tercer mes ($P=0,0160$). De tota manera, no s'observen diferències significatives en la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal entre el primer i el tercer mes de tractament ($P=0,3670$).

7.2.2.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal en els mascles exposats a 12 hores de llum artificial ha estat de $3,26 \pm 1,03\%$ al primer mes, de $2,55 \pm 1,11\%$ al segon mes i de $2,70 \pm 0,97\%$ al tercer mes (Taula 7.2.2, Gràfic 7.2.2).

En el segon mes de tractament té lloc una reducció significativa de la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal ($P=0,0010$), assolint un valor que es manté estable en el tercer mes ($P=0,6180$).

7.2.2.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

En els tres mesos d'exposició dels mascles a condicions de foscor absoluta la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal ha estat de $2,95 \pm 1,06\%$, de $2,85 \pm 1,16\%$ i de $3,35 \pm 1,56\%$ (Taula 7.2.2, Gràfic 7.2.2).

Així doncs, al llarg del fotoperíode 3, la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal es manté estable entre el primer i el segon mes ($P=0,9240$), però s'incrementa de forma significativa en el tercer mes de tractament ($P=0,0310$).

7.2.2.4. Comparacions entre grups

Al llarg de tot el tractament experimental, la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial és significativament superior a la dels mascles control ($P<0,0001$). En el primer ($P=0,5580$) i el segon ($P=0,2650$) mes d'exposició dels mascles a foscor absoluta, la freqüència d'espermatozoides amb gota distal no difereix dels mascles control, però en el tercer mes és significativament superior ($P=0,0030$).

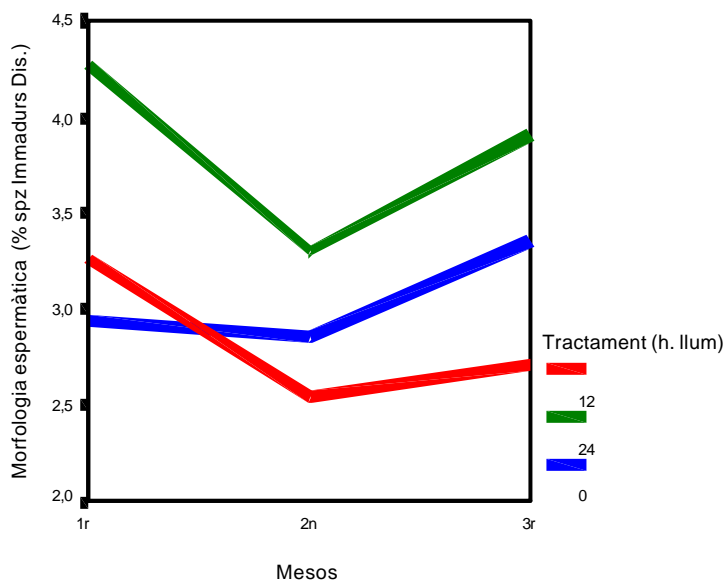
La freqüència d'espermatozoides amb gota distal en el primer ($P<0,0001$), segon ($P=0,0320$) i tercer ($P=0,0160$) mes d'experimentació és significativament superior en els mascles exposats a 0 hores de llum que en els mascles exposats a 24 hores de llum atificial.

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	4,27 ± 1,76 ^{*∇}	3,30 ± 1,24 ^{1*∇}	3,92 ± 1,38 ^{2*∇}
12	3,26 ± 1,03	2,55 ± 1,11 ¹	2,70 ± 0,97 ³
0	2,95 ± 1,06	2,85 ± 1,16	3,35 ± 1,56 ^{2*∇}

Taula 7.2.2. Freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % ± SD (*n*=10).

¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ³Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 7.2.2. Freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7.3. Espermatozoides aberrants

7.3.1. Anomalies en la forma del cap

7.3.1.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles exposats a 24 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap ha estat d' $1,09 \pm 0,77\%$, de $0,95 \pm 0,87\%$ i d' $1,40 \pm 1,96\%$ al primer, segon i tercer mes respectivament (Taula 7.3.1, Gràfic 7.3.1).

Aquest paràmetre es manté estable al llarg dels tres mesos d'experimentació ($P=0,7512$).

7.3.1.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap en els mascles exposats a 12 hores de llum artificial ha estat de $0,92 \pm 0,78\%$, $0,75 \pm 0,49\%$ i $0,69 \pm 0,36\%$ en cadascun dels mesos de tractament (Taula 7.3.1, Gràfic 7.3.1).

Així doncs, no es produeixen canvis en la freqüència d'aquesta malformació al llarg del període experimental ($P=0,0530$).

7.3.1.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

Al llarg dels tres mesos d'exposició dels mascles a 0 hores de llum artificial, la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap ha estat de $0,44 \pm 0,24\%$ en el primer mes, de $0,42 \pm 0,27\%$ en el segon mes i de $0,39 \pm 0,25\%$ en el tercer mes (Taula 7.3.1, Gràfic 7.3.1).

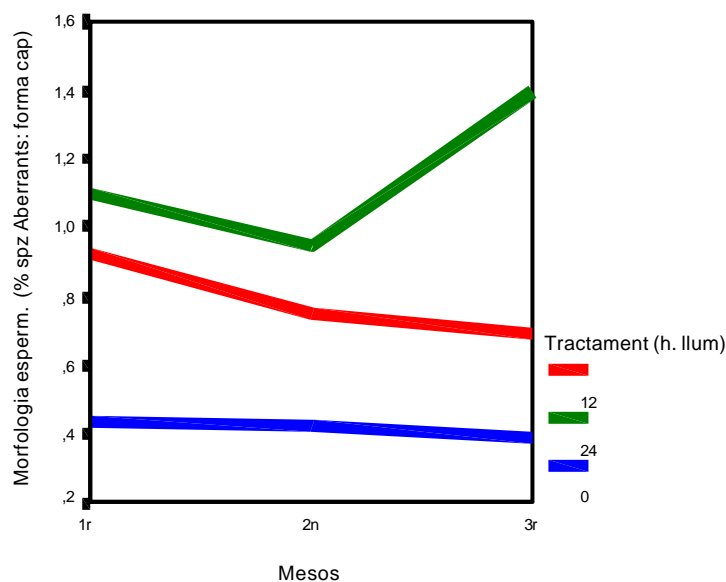
Resultats

Igualment com en el fotoperíode 1 i el fotoperíode 2, no es produeixen canvis en la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap al llarg del tractament experimental ($P=0,5680$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	1,09 ± 0,77	0,95 ± 0,87	1,40 ± 1,96 ^{*∇}
12	0,92 ± 0,78	0,75 ± 0,49	0,69 ± 0,36
0	0,44 ± 0,24 ^{*∇}	0,42 ± 0,27 ^{*∇}	0,39 ± 0,25

Taula 7.3.1. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % ± SD ($n=10$).

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). ∇ Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 7.3.1. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7.3.1.4. Comparacions entre grups

En el primer ($P=0,4890$) i el segon ($P=0,0890$) mes de tractament la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap no difereix entre els mascles exposats a 24 i 12 hores de llum artificial, però en el tercer mes és significativament superior en els mascles exposats a llum contínua ($P<0,0001$). La freqüència d'aquesta malformació és significativament inferior en els mascles exposats a 0 hores de llum artificial que en els mascles control en el primer ($P=0,0040$) i el segon ($P=0,0010$) mes, per bé que no s'observen diferències significatives entre ambdós grups en el tercer mes de tractament ($P=0,1400$).

En comparar els tractaments de llum contínua i foscor absoluta s'observa que la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma del cap és significativament superior en els mascles exposats a 24 hores de llum artificial al llarg dels tres mesos d'experimentació ($P<0,0001$).

7.3.2. Anomalies en la mida del cap

7.3.2.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap en els mascles exposats a 24 hores de llum artificial en el primer, el segon i el tercer mes de tractament ha estat de $0,37 \pm 0,20\%$, $0,33 \pm 0,24\%$ i $0,33 \pm 0,31\%$ respectivament (Taula 7.3.2, Gràfic 7.3.2).

Així doncs, no existeixen canvis en la freqüència d'aquesta malformació al llarg del fotoperíode 1 ($P=0,6080$).

7.3.2.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

En els mascles exposats a 12 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap ha estat de $0,32 \pm 0,31\%$ al primer mes, de $0,26 \pm 0,22\%$ al segon mes i de $0,16 \pm 0,14$ al tercer mes (Taula 7.3.2, Gràfic 7.3.2).

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap es manté constant entre el primer i el segon mes de tractament ($P=0,3080$), però disminueix de forma significativa en el tercer mes ($P=0,0060$).

7.3.2.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap en els mascles exposats a 0 hores de llum artificial ha estat, en cadascun dels mesos de tractament, de $0,21 \pm 0,14\%$, de $0,23 \pm 0,20\%$ i de $0,23 \pm 0,17\%$ (Taula 7.3.2, Gràfic 7.3.2).

Per tant, la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap es manté estable al llarg dels mesos d'experimentació ($P=0,7480$).

7.3.2.4. Comparacions entre grups

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial no difereix dels mascles control en el primer ($P=0,5760$) i el segon ($P=0,0830$) mes de tractament, però és significativament superior en el tercer mes ($P<0,0001$). En els mascles exposats a 0 hores de llum artificial, la freqüència d'aquesta malformació és significativament inferior a la dels mascles control en el primer mes de

tractament ($P=0,0040$), per bé que no difereix en el segon mes ($P=0,5920$) i és significativament superior en el tercer mes ($P=0,0480$).

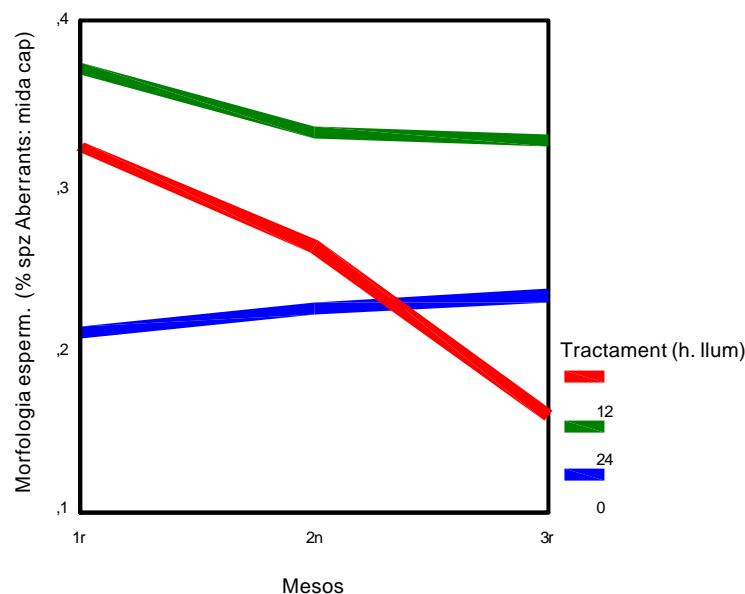
Al llarg dels tres mesos de tractament experimental, la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap ha estat significativament inferior en els mascles mantinguts en foscor absoluta que en els mascles mantinguts en condicions de llum contínua ($P<0,0001$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	0,37 ± 0,20	0,33 ± 0,24	0,33 ± 0,31 *
12	0,32 ± 0,32	0,26 ± 0,22	0,16 ± 0,14 ^{1,2}
0	0,21 ± 0,14 ^{*∇}	0,23 ± 0,20 [∇]	0,23 ± 0,17 ^{*∇}

Taula 7.3.2. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % ± SD ($n=10$).

¹Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ²Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 7.3.2. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida del cap al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7.3.3. Anomalies en el nombre de caps

7.3.3.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En cadascun dels tres mesos d'exposició dels mascles a 24 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps ha estat de $0,23 \pm 0,16\%$, de $0,24 \pm 0,19\%$ i de $0,22 \pm 0,17\%$ (Taula 7.3.3, Gràfic 7.3.3).

Així doncs, no s'observen diferències significatives entre el primer, el segon i el tercer mes d'experimentació ($P=0,8370$).

7.3.3.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

En els mascles mantinguts a 12 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps ha estat de $0,22 \pm 0,18\%$ al primer mes, de $0,29 \pm 0,22\%$ al segon mes i de $0,19 \pm 0,14\%$ al tercer mes (Taula 7.3.3, Gràfic 7.3.3).

Entre el primer i el segon mes de tractament la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps es manté estable ($P=0,1700$), produint-se una reducció significativa en el tercer mes ($P=0,0020$).

7.3.3.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps en els mascles confinats a 0 hores de llum artificial ha estat de $0,22 \pm 0,19\%$, $0,28 \pm 0,36\%$ i $0,11 \pm 0,14\%$ al primer, segon i tercer mes del tractament (Taula 7.3.3, Gràfic 7.3.3).

Així doncs, malgrat que en el primer i segon mes d'experimentació la freqüència d'aquesta malformació es manté estable ($P=0,4060$), s'observa un descens significatiu en el tercer mes ($P<0,0001$).

7.3.3.4. Comparacions entre grups

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps no difereix de forma estadísticament significativa entre els mascles exposats a 24 hores i a 12 hores de llum artificial al llarg dels tres mesos d'experimentació ($P=0,3570$). En els mascles exposats a 0 hores de llum artificial la freqüència d'aquesta malformació no difereix de forma significativa dels mascles control en

Resultats

el primer ($P=0,9500$) i el segon ($P=0,9360$) mes, però és significativament inferior en el tercer mes de tractament ($P<0,0001$).

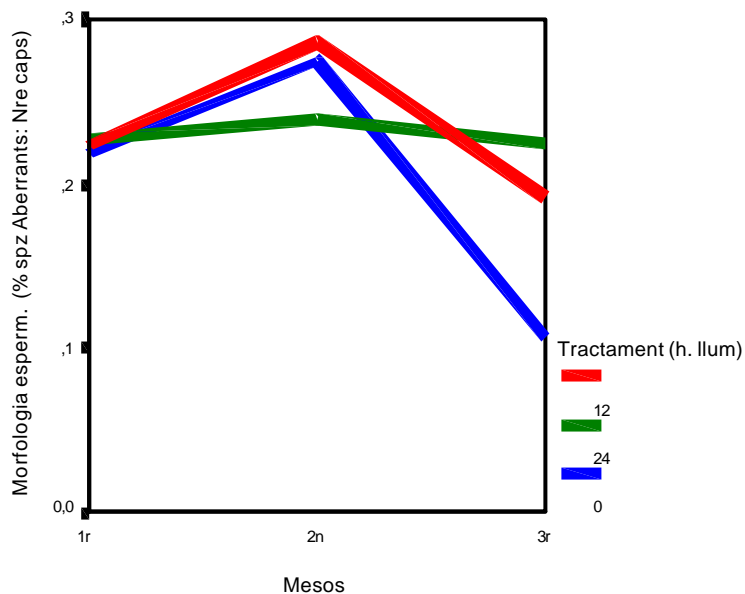
La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps no difereix en el primer ($P=0,9750$) i el segon ($P=0,7140$) mes de tractament entre els mascles exposats a llum contínua i a foscor absoluta, però en el tercer mes és significativament inferior en els mascles exposats a foscor absoluta ($P<0,0001$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	0,23 ± 0,16	0,24 ± 0,19	0,22 ± 0,17
12	0,22 ± 0,18	0,29 ± 0,22	0,19 ± 0,14 ¹
0	0,22 ± 0,19	0,28 ± 0,36	0,11 ± 0,14 ^{1,3*∇}

Taula 7.3.3. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % ± SD ($n=10$).

¹Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes; ²Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 7.3.3. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de caps al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7.3.4. Anomalies en la forma de la cua

7.3.4.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua en els mascles exposats a 24 hores de llum artificial ha estat de $5,97 \pm 7,38\%$ al primer mes, de $3,86 \pm 4,52\%$ al segon mes i de $4,66 \pm 5,19\%$ al tercer mes (Taula 7.3.4, Gràfic 7.3.4).

Aquestes diferències entre el primer i el segon mes ($P=0,0780$) i entre el segon i el tercer mes ($P=0,3970$) no són estadísticament significatives.

7.3.4.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

En els mascles mantinguts a 12 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua a cada mes de tractament és de $2,76 \pm 1,56\%$, de $2,86 \pm 1,92\%$, i de $2,40 \pm 1,06\%$ (Taula 7.3.4, Gràfic 7.3.4).

Aquestes diferències al llarg del període experimental no són estadísticament significatives ($P=0,1360$).

7.3.4.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

En els mascles exposats a condicions d'obscuritat la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua ha estat de $4,71 \pm 2,50\%$ al primer mes, de $4,28 \pm 2,68\%$ al segon mes i de $3,24 \pm 2,81$ al tercer mes (Taula 7.3.4, Gràfic 7.3.4).

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua disminueix de forma significativa en el tercer mes de tractament ($P=0,0250$).

7.3.4.4. Comparacions entre grups

En els mascles exposats a 24 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua és significativament superior a la dels mascles control en el primer ($P=0,0040$) i el tercer ($P<0,0001$) mes, però no en el segon mes de tractament ($P=0,1060$). En els mascles exposats a 0 hores de llum artificial la freqüència d'aquesta malformació és significativament superior en el primer i el segon mes de tractament ($P<0,0001$), però no difereix dels mascles control en el tercer mes ($P=0,1980$).

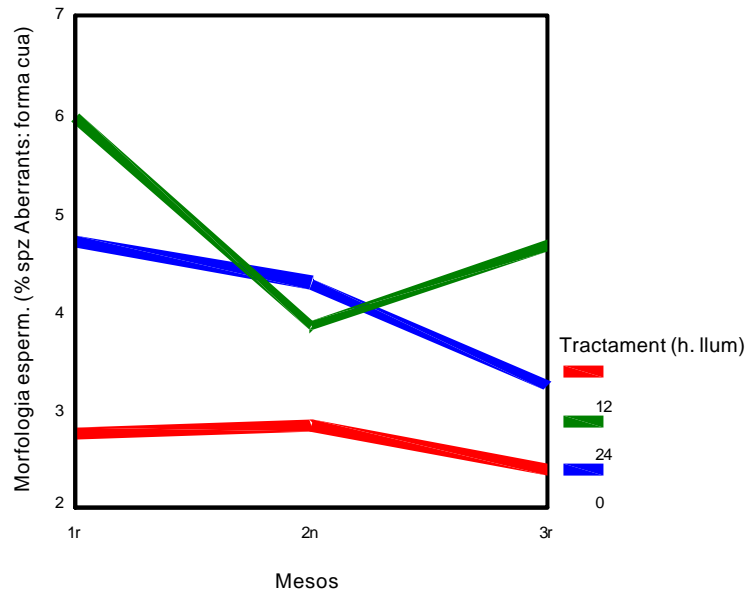
En comparar els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial no s'observen diferències en el primer ($P=0,3840$) i el segon ($P=0,6560$) mes, però en el tercer mes la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua és significativament superior en els mascles exposats a llum contínua ($P=0,0130$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	5,97 ± 7,38 *	3,86 ± 4,52	4,66 ± 5,19 * [∇]
12	2,76 ± 1,56	2,86 ± 1,92	2,40 ± 1,06
0	4,71 ± 2,50 *	4,28 ± 2,68 *	3,24 ± 2,81 ^{1,2}

Taula 7.3.4. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % ± SD ($n=10$).

¹Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ²Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 7.3.4. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7.3.5. Anomalies en la mida de la cua

7.3.5.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles exposats a 24 hores de llum artificial la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua ha estat d' $1,27 \pm 0,52\%$, d' $1,17 \pm 0,48\%$ i d' $1,02 \pm 0,44\%$ al primer, segon i tercer mes de tractament (Taula 7.3.5, Gràfic 7.3.5).

La freqüència d'aquesta malformació es manté estable entre el primer i el segon mes de tractament ($P=0,4670$), però disminueix de forma significativa en el tercer mes respecte de l'inici de l'experimentació ($P=0,0140$).

7.3.5.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua dels mascles exposats a 12 hores de llum artificial és de $0,93 \pm 1,36\%$ al primer mes, de $0,63 \pm 0,36\%$ al segon mes i de $0,58 \pm 0,23\%$ al tercer mes (Taula 7.3.5, Gràfic 7.3.5).

En el segon mes de tractament es produeix un descens significatiu de la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua ($P=0,0160$), assolint un valor que es manté estable en el tercer mes ($P=0,8700$).

7.3.5.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

Durant els tres mesos d'exposició dels mascles a 0 hores de llum artificial, la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua ha estat de $0,91 \pm 0,31\%$, $0,96 \pm 0,82\%$ i $0,46 \pm 0,52\%$ (Taula 7.3.5, Gràfic 7.3.5).

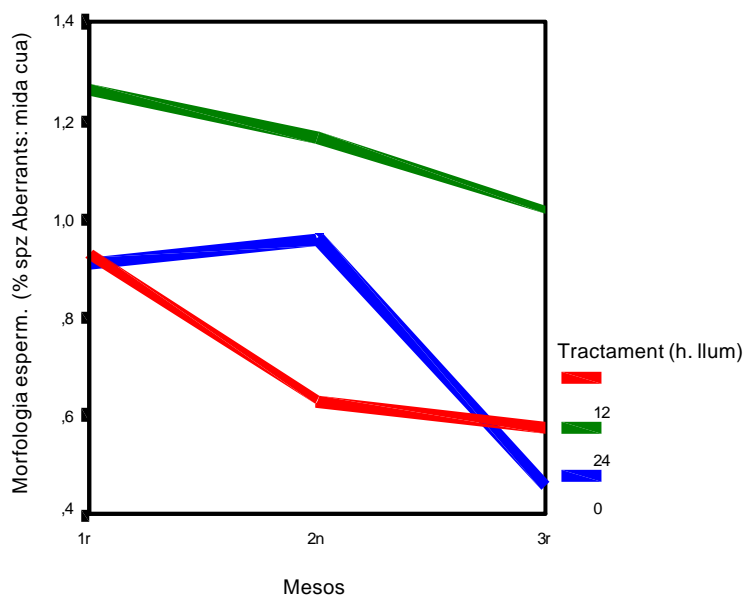
Així doncs, malgrat que en el primer i el segon mes la freqüència d'aquesta malformació es manté estable ($P=0,8800$), en el tercer mes es produeix un descens significatiu ($P<0,0001$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	1,27 ± 0,52	1,17 ± 0,48 ^{*∇}	1,02 ± 0,44 ^{3*∇}
12	0,93 ± 1,36	0,63 ± 0,36 ¹	0,58 ± 0,23 ³
0	0,91 ± 0,31	0,96 ± 0,82 [*]	0,46 ± 0,52 ²

Taula 7.3.5. Frequència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % ± SD (n=10).

¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ³Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

^{*}Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 7.3.5. Frequència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

7.3.5.4. Comparacions entre grups

Tot i que no s'observen diferències significatives entre els mascles exposats a 24 i 12 hores de llum artificial en el primer mes de tractament ($P=0,1150$), la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua en el segon ($P<0,0001$) i el tercer ($P<0,0001$) mes és significativament superior en els mascles exposats a llum contínua. La freqüència d'aquesta malformació no difereix entre els mascles exposats a 0 i 12 hores de llum en el primer ($P=0,9930$) i el tercer ($P=0,1250$) mes de tractament, però en el segon mes és significativament superior en els mascles confinats a foscor absoluta ($P=0,0010$).

En el primer mes de tractament la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la mida de la cua no difereix entre els mascles exposats a 24 i 0 hores de llum artificial ($P=0,0680$), però en el segon ($P=0,0410$) i el tercer ($P<0,0001$) mes és significativament superior en els mascles mantinguts en condicions de llum contínua.

7.3.6. Anomalies en el nombre de cues

7.3.6.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues en els mascles exposats a 24 hores de llum artificial ha estat de $0,28 \pm 0,13\%$ al primer mes, de $0,27 \pm 0,16\%$ al segon mes i de $0,24 \pm 0,12\%$ al tercer mes (Taula 7.3.6, Gràfic 7.3.6).

Així doncs, no existeixen diferències significatives en la freqüència d'aquesta malformació al llarg del tractament ($P=0,2790$).

7.3.6.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

Al llarg del fotoperíode la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues ha estat de $0,24 \pm 0,16\%$ al primer mes, de $0,28 \pm 0,17\%$ al segon mes i de $0,21 \pm 0,15\%$ al tercer mes (Taula 7.3.6, Gràfic 7.3.6).

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues es manté estable entre el primer i el segon mes de tractament ($P=0,5310$), però disminueix de forma significativa en el tercer mes ($P=0,0190$).

7.3.6.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

En els mascles mantinguts a 0 hores de llum artificial, la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues ha estat de $0,16 \pm 0,11\%$, $0,18 \pm 0,15\%$, i $0,67 \pm 0,80\%$ al primer, segon i tercer mes, respectivament (Taula 7.3.6, Gràfic 7.3.6).

Així doncs, en el tercer mes de confinament dels mascles a condicions de foscor absoluta es produeix un increment significatiu de la freqüència d'aquesta malformació ($P<0,0001$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	0,28 ± 0,13	0,27 ± 0,16	0,24 ± 0,12
12	0,24 ± 0,16	0,28 ± 0,17	0,21 ± 0,15 ¹
0	0,16 ± 0,11 ^{*∇}	0,18 ± 0,15 ^{*∇}	0,67 ± 0,80 1,2*∇

Taula 7.3.6. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % ± SD ($n=10$).

¹Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ²Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

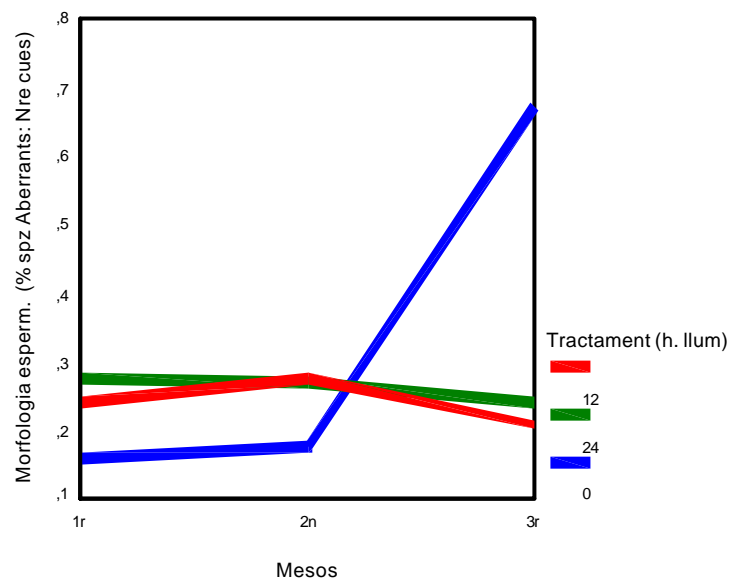
*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). ∇Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.

7.3.6.4. Comparacions entre grups

Els mascles exposats a 24 i 12 hores de llum artificial no difereixen en la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues en el primer ($P=0,3360$), el segon ($P=0,9860$) i el tercer ($P=0,9350$) mes de tractament. En canvi, en els mascles exposats a 0 hores de llum la freqüència d'aquesta malformació és significativament inferior a la dels mascles control en el primer ($P=0,0220$) i el segon ($P=0,0010$) mes d'experimentació, però significativament superior en el tercer mes ($P<0,0001$).

La freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues en el primer ($P<0,0001$) i el segon ($P<0,0001$) mes de tractament és significativament inferior en els mascles exposats a 0 hores, mentre que en

el tercer mes és significativament inferior en els mascles exposats a 24 hores de llum artificial ($P < 0,0001$).



Gràfic 7.3.6. Freqüència d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

8. Estudi comparatiu de la producció espermàtica

8.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

La producció espermàtica diària dels mascles exposats al llarg de tres mesos a condicions experimentals de 24 hores de llum artificial és de $12,13 \pm 33,65$ spz x

$10^9/\text{dia}$, $13,26 \pm 13,63 \text{ spz} \times 10^9/\text{dia}$ i $12,97 \pm 17,72 \text{ spz} \times 10^9/\text{dia}$ (Taula 8, Gràfic 8).

No existeixen diferències significatives en la producció espermàtica al llarg del període de tractament ($P=0,8000$).

8.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

En els mascles mantinguts a 12 hores de llum artificial, la producció espermàtica diària ha estat de $33,35 \pm 32,92 \text{ spz} \times 10^9/\text{dia}$ en el primer mes, de $34,60 \pm 39,38 \text{ spz} \times 10^9/\text{dia}$ en el segon mes i de $29,14 \pm 39,84 \text{ spz} \times 10^9/\text{dia}$ en el tercer mes (Taula 8, Gràfic 8).

Tot i que es manté estable en el primer i el segon mes de tractament experimental ($P=0,7630$), en el tercer mes es produeix un descens significatiu de la producció espermàtica ($P=0,0040$).

8.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

La producció espermàtica diària dels mascles exposats a condicions experimentals de 0 hores de llum artificial ha estat de $17,10 \pm 21,32 \text{ spz} \times 10^9/\text{dia}$, $20,91 \pm 45,20 \text{ spz} \times 10^9/\text{dia}$ i $30,49 \pm 43,89 \text{ spz} \times 10^9/\text{dia}$ en cada mes de tractament (Taula 8, Gràfic 8).

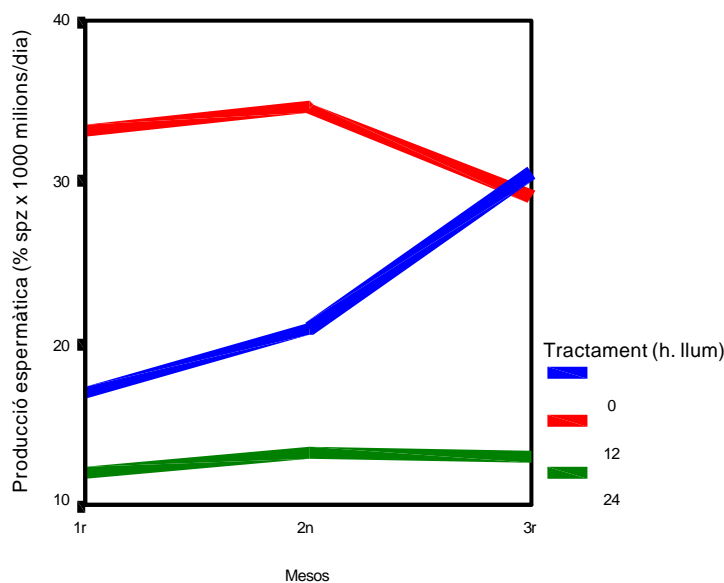
Així doncs, es produeix un augment significatiu de la producció espermàtica al segon ($P<0,0001$) i al tercer ($P<0,0001$) mes d'exposició dels mascles a foscor absoluta.

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	12,13 ± 33,65 *	13,26 ± 13,63 * [∇]	12,97 ± 17,72 * [∇]
12	33,35 ± 32,92	34,60 ± 39,38	29,14 ± 39,84 ²
0	17,10 ± 21,32 *	20,91 ± 45,20 ^{1*}	30,49 ± 43,89 ^{2,3}

Taula 8. Producció espermàtica diària en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en Nre SPZ.10⁹/ejaculat ± SD (n=10).

¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes. ³Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 8. Producció espermàtica diària al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

8.4. Comparacions entre grups

Al llarg dels tres mesos d'experimentació, la producció espermàtica diària dels mascles exposats a 24 hores de llum artificial és significativament inferior a la dels mascles exposats a 12 hores ($P < 0,0001$). La producció espermàtica dels mascles exposats a 0 hores és significativament inferior a la del grup control en el primer ($P < 0,0001$) i el segon ($P < 0,0001$) mes de tractament, no observant-se diferències significatives en el tercer mes ($P = 0,8580$).

Malgrat que els mascles exposats a llum contínua i a foscor absoluta no difereixen en la producció espermàtica del primer mes de tractament ($P = 0,0560$), en el segon ($P < 0,0001$) i el tercer ($P < 0,0001$) mes la producció és significativament inferior en els mascles mantinguts en condicions de llum contínua.

9. Estudi comparatiu del nombre de dosis seminals

9.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

El nombre de dosis seminals obtingudes per ejaculat dels mascles exposats a condicions experimentals de 24 hores de llum artificial ha estat de $21,25 \pm 16,82$ al primer mes, de $22,15 \pm 6,82$ al segon mes i de $21,69 \pm 8,86$ al tercer mes (Taula 9, Gràfic 9).

Així doncs, al llarg del fotoperíode 1 no es produeixen diferències significatives en el nombre de dosis seminals ($P = 0,8000$).

9.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

A partir dels mascles mantinguts a 12 hores de llum artificial, el nombre de dosis seminals obtingudes per ejaculat ha estat de $56,39 \pm 16,46$ al primer mes, de $59,03 \pm 19,69$ al segon mes i de $49,44 \pm 19,92$ al tercer mes (Taula 9, Gràfic 9).

Tot i que el nombre de dosis seminals es manté estable en el primer i segon mes d'experimentació ($P=0,7630$), en el tercer mes es produeix una reducció significativa del nombre de dosis seminals per dia ($P=0,0040$).

9.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

Al llarg del fotoperíode 3, el nombre de dosis seminals obtingudes per ejaculat ha estat de $28,24 \pm 10,66$, de $34,68 \pm 22,60$ i de $50,87 \pm 21,94$ en els tres mesos de confinament (Taula 9, Gràfic 9).

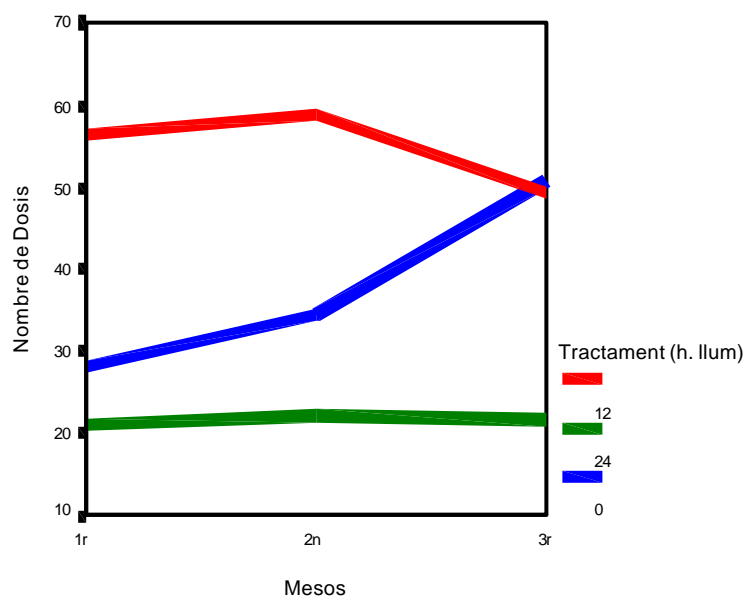
Malgrat que aquest paràmetre es manté estable entre el primer i segon mes ($P=0,1900$), s'observa un augment significatiu del nombre de dosis seminals per dia al tercer mes d'experimentació ($P<0,0001$).

Tractament (hores de llum)	Mesos		
	1r	2n	3r
24	21,25 ± 16,82 *	22,15 ± 6,82 * [∇]	21,69 ± 8,86 * [∇]
12	56,39 ± 16,46	59,03 ± 19,69	49,44 ± 19,92 ²
0	28,24 ± 10,66 *	34,68 ± 22,60 ^{1*}	50,87 ± 21,94 ^{2,3}

Taula 9. Nombre de dosis seminal obtingudes per ejaculat en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana ± SD (n=10).

¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el segon mes. ²Valors estadísticament diferents entre el segon i el tercer mes; ³Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.



Gràfic 9. Nombre de dosis seminals obtingudes per ejaculat al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

9.4. Comparacions entre grups

El nombre de dosis seminals obtingudes per ejaculat en els mascles confinats a 24 hores de llum artificial és significativament inferior a la dels mascles control al llarg de tot el període d'experimentació ($P < 0,0001$). En els mascles exposats a 0 hores de llum el nombre de dosis per ejaculat és significativament inferior al grup control en el primer mes ($P < 0,0001$) i significativament superior en el segon mes ($P < 0,0001$) de tractament, no observant-se diferències en el tercer mes ($P = 0,8580$).

Tot i que el nombre de dosis seminals produïdes pels mascles mantinguts en llum contínua és similar a la dels mascles mantinguts en foscor absoluta en el primer mes de tractament ($P = 0,0560$), en el segon ($P < 0,0001$) i el tercer ($P < 0,0001$) mes és significativament superior en els mascles exposats a foscor absoluta.

10. Estudi comparatiu del contingut de proteïna total

10.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

La quantitat de proteïna total del plasma seminal dels mascles mantinguts a 24 hores de llum artificial al primer i tercer mes de tractament ha estat de $16,53 \pm 4,05 \mu\text{g/ml}$ i de $12,43 \pm 5,12 \mu\text{g/ml}$, respectivament (Taula 10, Gràfic 10).

Aquests valors obtinguts no són significativament diferents entre sí ($P = 0,4290$).

10.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

En els mascles exposats a 12 hores de llum artificial, la concentració de proteïna total del plasma seminal és d' $11,88 \pm 2,54 \mu\text{g/ml}$ en el primer mes i de $9,54 \pm 2,31 \mu\text{g/ml}$ en el tercer mes (Taula 10, Gràfic 10).

Així doncs, no existeixen diferències significatives en la quantitat de proteïna del plasma seminal al llarg del tractament ($P=0,7650$).

10.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

En el primer i tercer mes de confinament dels mascles a condicions d'obscuritat el contingut de proteïna del plasma seminal és, respectivament, de $14,83 \pm 3,60$ $\mu\text{g/ml}$ i de $13,83 \pm 4,24$ $\mu\text{g/ml}$ (Taula 10, Gràfic 10).

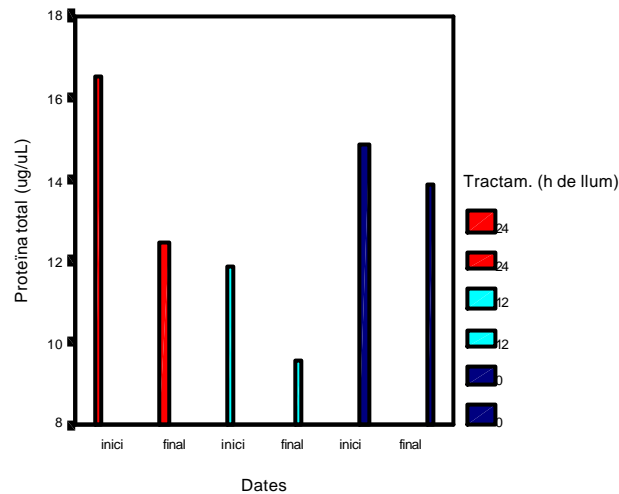
Aquests resultats no difereixen de forma estadísticament significativa ($P=0,9980$).

10.4. Comparacions entre grups

En el primer i tercer mes d'experimentació el contingut de proteïna total del plasma seminal no difereix entre els mascles exposats a 24 i 12 hores de llum ($P=0,9987$), ni entre mascles exposats a 0 i 12 hores de llum ($P=0,4000$), ni entre els mascles exposats a 24 i 0 hores de llum artificial ($P=0,9998$).

Tractament (hores de llum)	Mesos	
	1r	3r
24	$16,53 \pm 4,05$	$12,43 \pm 5,12$
12	$11,88 \pm 2,54$	$9,54 \pm 2,31$
0	$14,83 \pm 3,60$	$13,83 \pm 4,24$

Taula 10. Concentració de proteïna total del plasma seminal en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ ($n=10$).



Gràfic 10. Concentració de proteïna total del plasma seminal al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

11. Identificació de les proteïnes amb residus fosforil·lats de tirosina

A partir del Western Immunoblotting no s'observen diferències en els patrons de bandes entre els diferents tractaments analitzats ni al primer ni al tercer mes d'exposició dels mascles a les condicions experimentals; de tota manera, existeix una certa variabilitat entre individus. En cadascun dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial s'identifiquen dues bandes majoritàries de proteïna, una d'uns 200 kDa i una altra d'entre 85-100 kDa, respectivament (Figura 11.1).

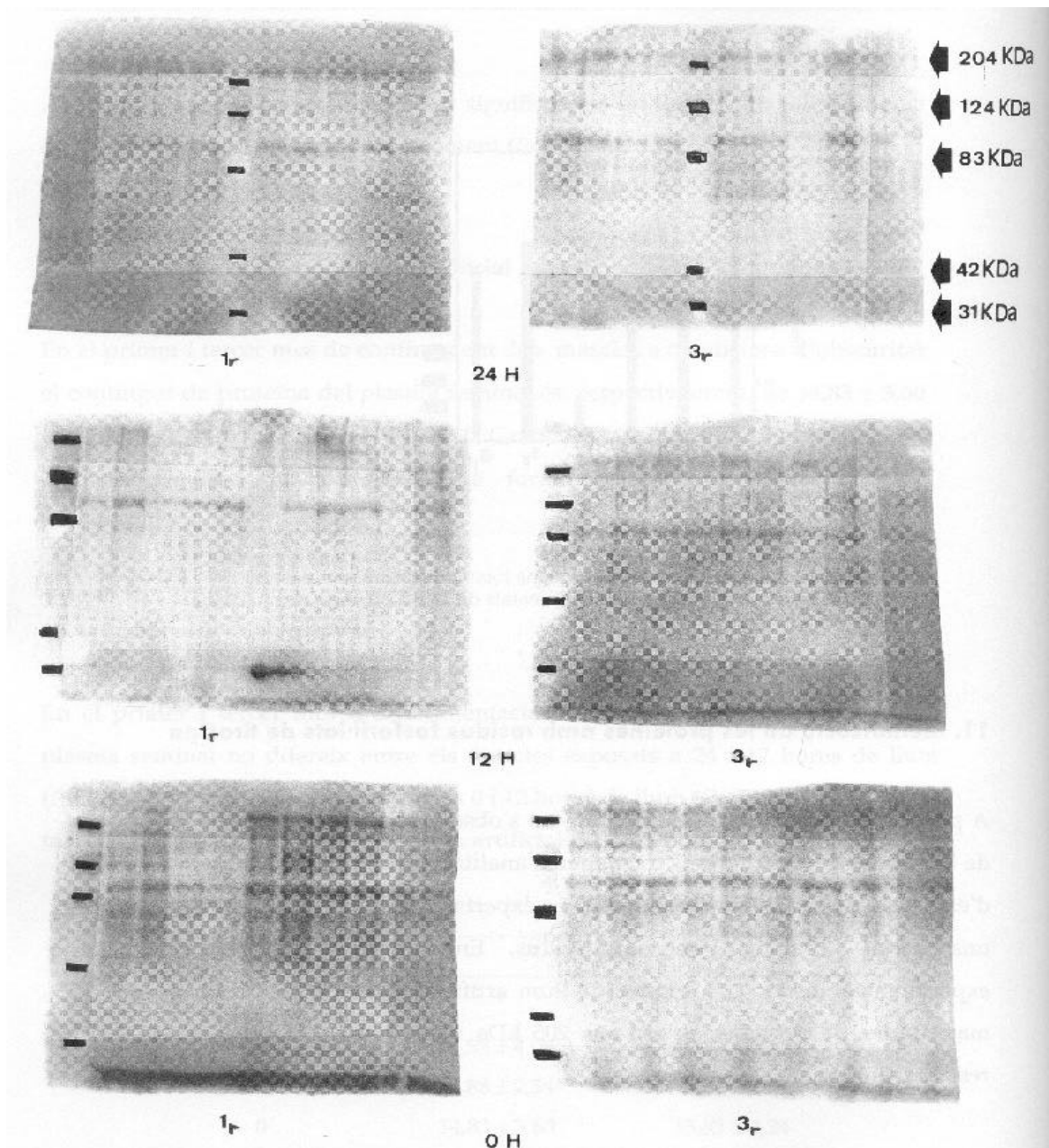
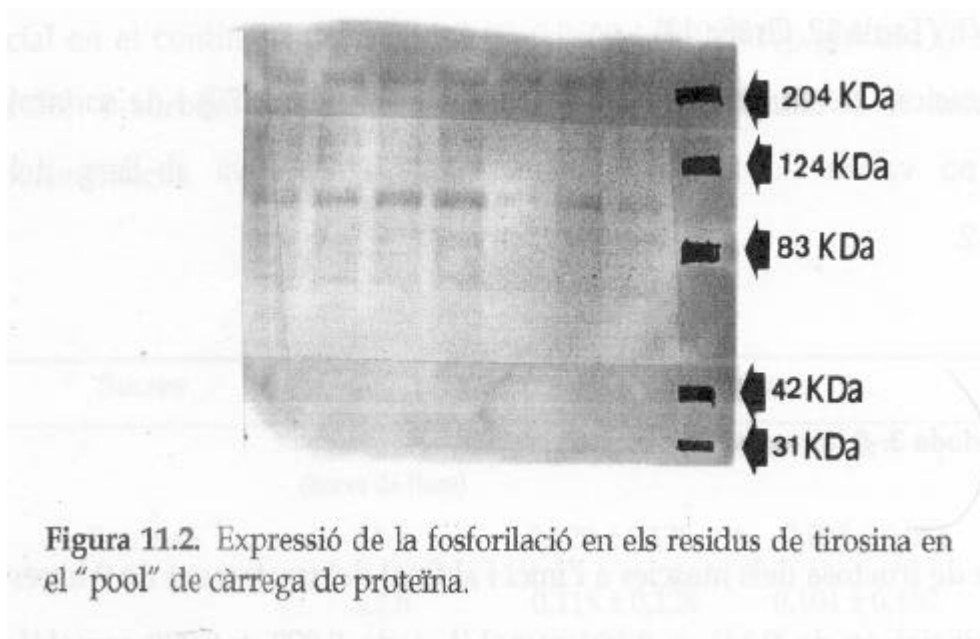


Figura 11.1. Expressió de la fosforil·lació en els residus de tirosina en el plasma seminal de mascles porcins exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

A fi de demostrar que les diferències observades són degudes a l'efecte individu i no a l'efecte tractament s'ha procedit a la realització d'un "pool" de càrrega de proteïna constituït per una mescla de plasma seminal de mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. A la Figura 11.2 pot observar-se

que el patró de bandes d'aquest "pool" és similar al patró obtingut en cadascun dels tractaments per separat.



12. Estudi comparatiu del contingut de fructosa, glucosa i sorbitol

12.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles mantinguts en condicions de 24 hores de llum artificial, la concentració de fructosa al primer i al tercer mes de confinament ha estat de $0,129 \pm 0,120$ mmol/L i de $0,033 \pm 0,054$ mmol/L, la concentració de glucosa de $0,013 \pm 0,017$ mmol/ i de $0,006 \pm 0,016$ mmol/L, i la concentració de sorbitol d' $1,528 \pm 0,484$ mmol/L i de $0,543 \pm 0,659$ mmol/L (Taula 12, Gràfic 12).

Així doncs, no es produeixen canvis significatius en el contingut de fructosa ($P=0,3370$), de glucosa ($P=0,9998$) i de sorbitol ($P=0,8440$) entre el primer i el tercer mes d'exposició a 24 hores de llum artificial.

12.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

En el primer i el tercer mes de confinament dels mascles a 12 hores de llum artificial, la concentració de fructosa ha estat de $0,118 \pm 0,128$ mmol/L i de $0,104 \pm 0,100$ mmol/L, la concentració de glucosa de $0,222 \pm 0,123$ mmol/L i de $0,258 \pm 0,167$ mmol/L, i la concentració de sorbitol d' $1,343 \pm 0,560$ mmol/L i d' $1,007 \pm 0,669$ mmol/L (Taula 12, Gràfic 12).

Les concentracions de fructosa ($P=0,9989$), de glucosa ($P=0,9370$) i de sorbitol ($P=0,9990$) no varien de forma estadísticament significativa al llarg del fotoperíode 2.

12.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

El contingut de fructosa dels mascles a l'inici i al final del tractament de 0 hores de llum artificial és de $0,141 \pm 0,100$ mmol/L i de $0,070 \pm 0,089$ mmol/L respectivament, el contingut de glucosa de $0,067 \pm 0,024$ mmol/L i de $0,077 \pm 0,016$ mmol/L, i el contingut de sorbitol de $2,493 \pm 3,250$ mmol/L i de $2,076 \pm 2,672$ mmol/L (Taula 12, Gràfic 12).

Per tant, en els mascles mantinguts en obscuritat no es produeixen canvis en la concentració de fructosa ($P=0,7480$), de glucosa ($P=0,9999$) i de sorbitol ($P=0,9950$) entre l'inici i el final del tractament.

12.4. Comparacions entre grups

La concentració de fructosa i sorbitol del plasma seminal en el primer ($P=0,9960$ i $P=0,9989$) i el tercer ($P=0,6810$ i $P=0,9940$) mes de tractament no difereix de forma significativa entre els mascles exposats a 24 i 12 hores de llum artificial, però la

Resultats

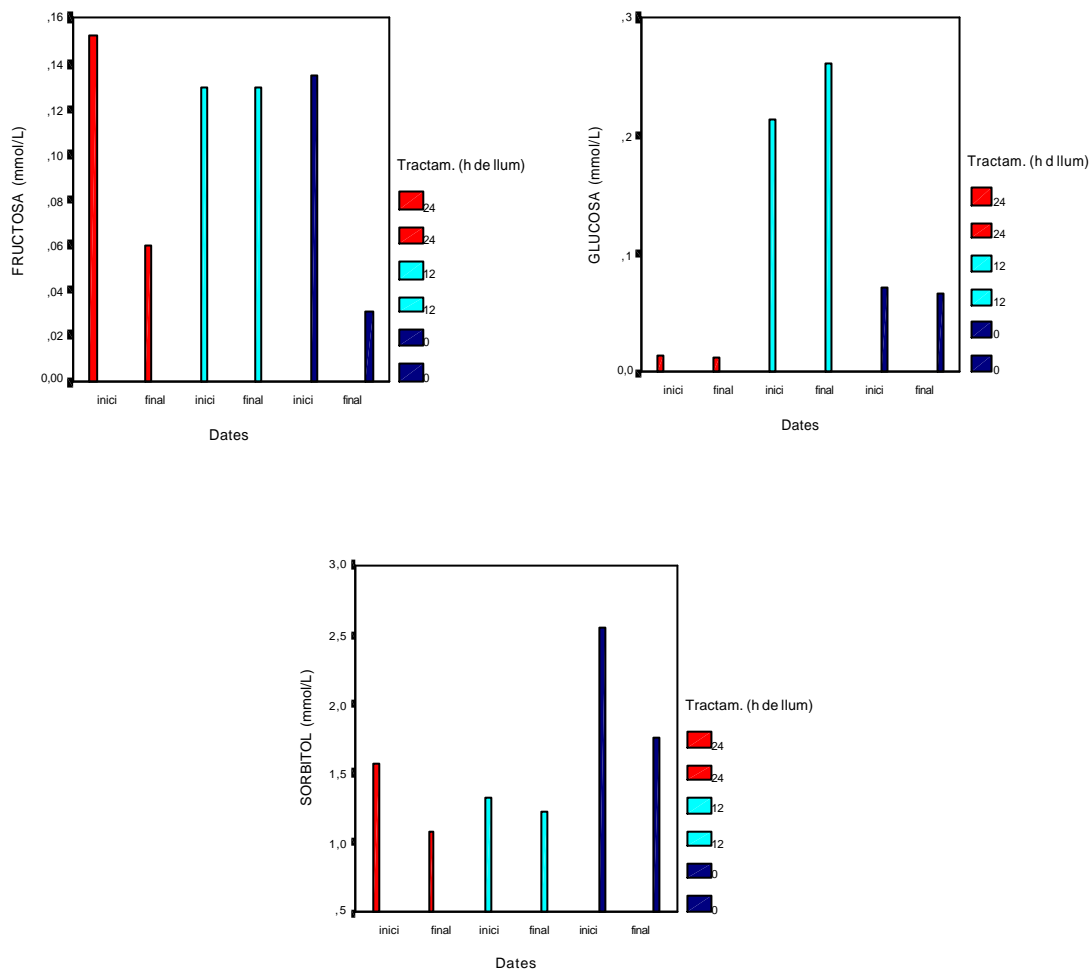
concentració de glucosa és significativament inferior en els mascles exposats a llum contínua ($P < 0,0001$). En els mascles exposats a 0 hores de llum la concentració de fructosa i sorbitol en el primer ($P = 0,9906$ i $P = 0,9997$) i el tercer ($P = 0,6810$ i $P = 0,4510$) mes de tractament no difereix dels mascles control, per bé que la concentració de glucosa és significativament inferior ($P = 0,0002$).

No s'observen diferències entre els mascles exposats a 24 hores i 0 hores de llum artificial en el contingut de fructosa ($P = 0,9609$ i $P = 0,6810$), glucosa ($P = 0,9999$ i $P = 0,4150$) i sorbitol ($P = 0,9979$ i $P = 0,4510$) en el primer i el tercer mes d'experimentació.

Sucres	Mesos		
	Tractament (hores de llum)	1r	3r
Fructosa	24 h	0,129 ± 0,120	0,033 ± 0,054
	12 h	0,118 ± 0,128	0,104 ± 0,100
	0 h	0,141 ± 0,100	0,007 ± 0,089
Glucosa	24 h	0,013 ± 0,017 *	0,006 ± 0,016
	*		
	12 h	0,222 ± 0,123	0,258 ± 0,167
	0 h	0,067 ± 0,024 *	0,077 ± 0,016
	*		
Sorbitol	24 h	1,528 ± 0,484	0,543 ± 0,659
	12 h	1,343 ± 0,560	1,007 ± 0,669
	0 h	2,493 ± 3,250	2,076 ± 2,672

Taula 12. Concentració de fructosa, glucosa i sorbitol en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en mmol/L ± SD ($n = 10$).

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control).



Gràfic 12. Concentració de fructosa, glucosa i sorbitol del plasma seminal al llarg dels tractaments experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial.

13. Estudi comparatiu de la fertilitat i la prolificitat

13.1. Fotoperíode 1: 24 hores de llum artificial

En els mascles exposats a 24 hores de llum artificial la fertilitat al primer i al tercer mes ha estat del 90% i del 88%, respectivament, i la prolificitat del 85,39% i del 91,87% (Taula 13, Gràfic 13.1 i 13.2).

Així doncs, en el tercer mes de confinament s'observa una disminució significativa del percentatge de mascles fèrtils ($P=0,0001$), per bé que la prolificitat es manté constant ($P=0,9960$).

13.2. Fotoperíode 2: 12 hores de llum artificial

La fertilitat dels mascles exposats a 12 hores de llum artificial ha estat del 70% a l'inici i del 55% al final del tractament, mentre que la prolificitat ha estat del 84,08% i del 70,97% (Taula 13, Gràfic 13.1 i 13.2).

El percentatge de mascles fèrtils disminueix de forma significativa en el tercer mes d'experimentació ($P=0,0001$) mentre que la prolificitat es manté estable ($P=0,9280$).

13.3. Fotoperíode 3: 0 hores de llum artificial

En condicions d'obscuritat, la fertilitat dels mascles és d'un 70% en el primer mes de confinament i d'un 30% en el tercer mes, i la prolificitat d'un 75,24% i un 90,74% (Taula 13, Gràfic 13.1 i 13.2).

Així doncs, en el tercer mes d'experimentació es produeix una disminució significativa de la freqüència de mascles fèrtils ($P < 0,0001$), per bé que la seva prolificitat es manté estable ($P = 0,9030$).

13.4. Comparacions entre grups

Al primer ($P = 0,0005$) i al tercer ($P = 0,0005$) mes de tractament la fertilitat dels mascles confinats a condicions de 24 hores de llum artificial és significativament superior a la dels mascles control, mentre que la prolificitat no difereix de forma significativa ($P = 0,9000$). La fertilitat dels mascles exposats a 0 hores de llum artificial no difereix dels mascles control en el primer ($P = 0,9998$) i el tercer ($P = 0,8890$) mes de tractament; tot i que la prolificitat no difereix en el primer mes ($P = 0,9000$), en el tercer mes és significativament inferior en els mascles confinats a foscor absoluta ($P < 0,0001$).

La fertilitat dels mascles mantinguts en condicions de llum contínua és significativament superior a la dels mascles mantinguts en foscor absoluta tant al primer ($P = 0,0005$) com al tercer ($P < 0,0001$) mes d'experimentació, mentre que la prolificitat no difereix entre ambdós tractaments ($P = 0,9000$).

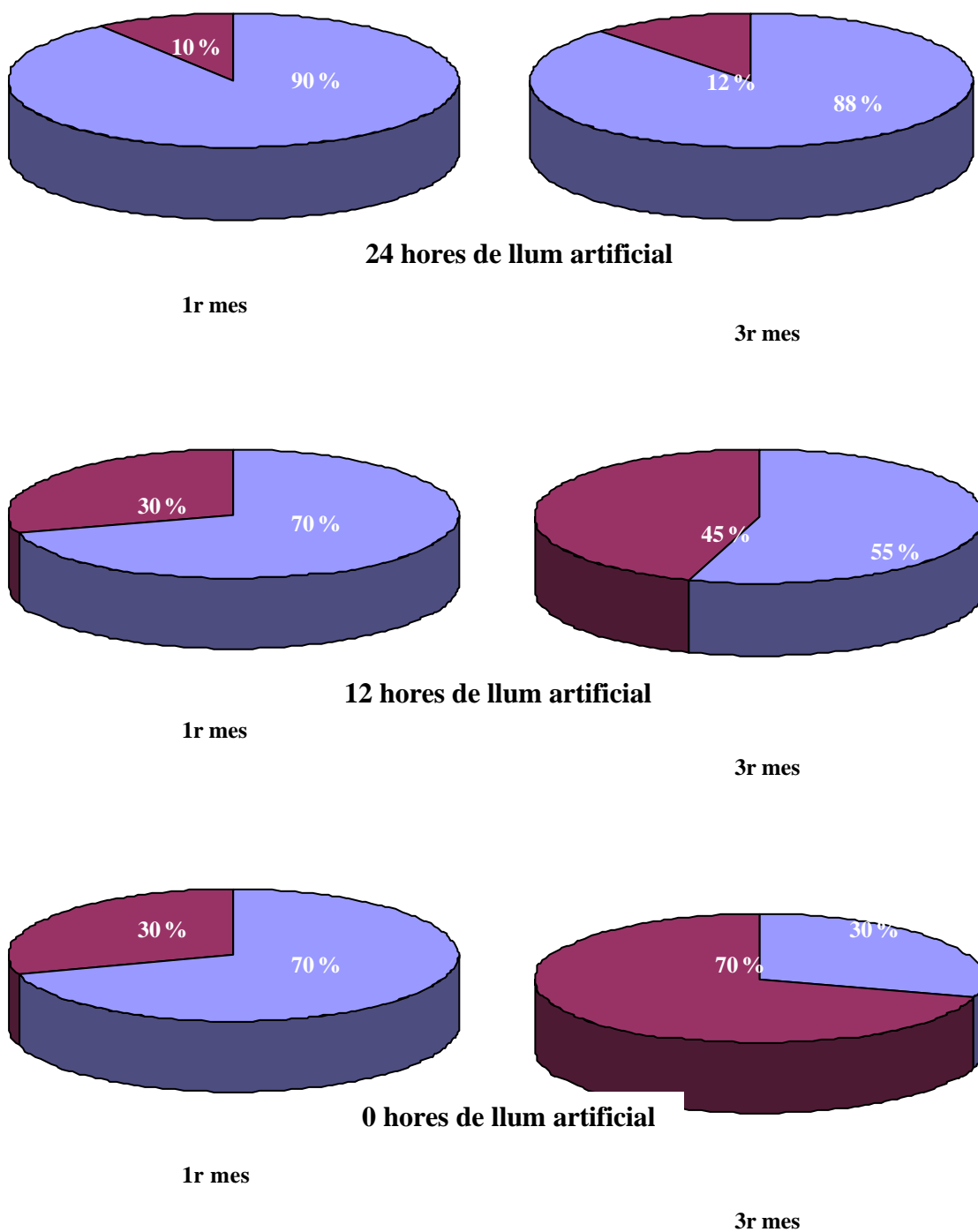
	Tractament (hores de llum)	Mesos	
		1r	3r
Fertilitat (%)	24 h	90,00 ± 0,10 *	88,00 ± 0,15 *
	12 h	70,00 ± 0,11	55,00 ± 0,12 ¹
	0 h	70,00 ± 0,15 [∇]	30,00 ± 0,10 ^{1*}
Prolificitat (%)	24 h	85,39 ± 13,36	91,87 ± 9,87
	12 h	84,08 ± 12,24	70,97 ± 18,95
	0 h	75,24 ± 38,83	90,74 ± 8,49

Taula 13. Fertilitat i prolificitat en mascles exposats a 24, 12 i 0 hores de llum artificial. Els resultats s'expressen com la mitjana en % ± SD ($n=10$).

¹Valors estadísticament diferents entre el primer i el tercer mes.

*Valors estadísticament diferents respecte del tractament de 12 hores de llum artificial (tractament control). [∇]Valors estadísticament diferents entre els tractaments de 24 i 0 hores de llum artificial.

Gràfic 13.1. Sectors que mostren els percentatges de fertilitat dels mascles al primer i tercer mes de cada tractament experimental.



DISCUSSIÓ

Els efectes de l'estació sobre l'activitat reproductiva dels mascles porcins depenen, fonamentalment, de la interacció entre la llum i la temperatura (Coleman i Kemp, 1990). Existeixen nombrosos estudis en els quals s'analitzen, sota condicions experimentals, els efectes de la llum i la temperatura com a factors independents sobre la qualitat del semen dels mascles porcins (Buxadé, 1984; Cameron, 1985; Chemineau i col., 1991; Love i col., 1993; Martinet i Mondain-Monval, 1993; Skinner i col., 1999; Sancho i col., 1999; Ciereszko i col., 2000), per bé que els resultats obtinguts pels diferents autors són divergents. Així, pel que fa a la llum, alguns descriuen un augment significatiu de la producció espermàtica en mascles exposats a poques hores diàries de llum (Claus i col., 1985), mentre que d'altres no observen una correlació entre il·luminació i producció espermàtica (Brandt i Diekman, 1985).

L'efecte de la llum sobre l'activitat reproductora dels mascles porcins està regulada per la glàndula pineal (Arendt, 1998). L'activitat d'aquesta glàndula està influenciada pel ritme estacional i, per tant, pel cicle diari de llum-fosc (Brandt i Diekman, 1985; Claus i Weiler, 1985; Minton i Wetteman, 1985; Diekman i col., 1991; Ebling i Hastings, 1992; Aleandri i col., 1996; Hadley, 1996;

Arendt, 1998). Aquesta regulació endocrina controla moltes de les funcions fisiològiques dels animals i té una importància capdal en la funció reproductora, no només de les espècies estacionals, sinó també de les espècies que es reproduïxen al llarg de tot l'any però que assoleixen la màxima fertilitat i prolificitat en determinades èpoques (Brandt i Diekman, 1985; Claus i Weiler, 1985; Niklowitz i Hoffmann, 1988; Dawson i Peters, 1996; Gorman i Yellon, 2001; Benstaali i col., 2002).

La majoria de les espècies domèstiques actuals procedeixen de reproductors estacionals i, per tant, mostren un patró reproductiu que depèn en gran mesura de l'ambient (Mauget, 1982, 1985; Dial i col., 1997; Kumar i Rani, 1999; Skinner i col., 1999; Tast i col., 2001). D'entre les espècies reproductores estacionals es poden distingir les de dia curt i les de dia llarg (Aleandri i col., 1996). Ambdues sincronitzen els seus ritmes fisiològics interns en base al fotoperíode, el qual pot modificar la pauta de secreció de melatonina de la glàndula pineal (Arendt i col., 1999; Alila-Johansson i col., 2001; Gorman i Lee, 2001; Gorman i Yellon, 2001; Abe i col., 2002; Benstaali i col., 2002). La melatonina és secretada durant l'escotofase i té un efecte inhibitor sobre l'eix hipotàlemhipofisari-gonadal en les espècies reproductores de dia llarg (Goldaman, 1991; Badura i Goldman, 1992; Pevet, 1993), mentre que en les espècies reproductores de dia curt la melatonina jugaria un paper estimulador de l'aparell reproductor (Karsh i col., 1994; Aleandri i col., 1996).

En el present estudi s'observa que la il·luminació contínua provoca un augment del volum de l'ejaculat en el primer mes de tractament, disminuint però en el tercer mes, mentre que la foscor absoluta no modifica aquest paràmetre. D'altra banda, la il·luminació contínua resulta en un augment progressiu del pH seminal al llarg del tractament experimental; la foscor absoluta, malgrat tenir un efecte més irregular, provoca també un augment del pH del semen al final del tractament. Aquests resultats estan en contradicció amb els aportats per Buxadé (1984) que afirma que el confinament de mascles postpuberals en condicions de

foscors absoluta i temperatura constant provoca una reducció del volum total del semen. Les glàndules sexuals accessòries proporcionen la major part del volum de l'ejaculat, entre el 60 i el 90% (Martín, 1982; Buxadé, 1984; McDonald, 1991); les propietats del plasma seminal, doncs, depenen en gran part de l'equilibri entre les secrecions procedents de cadascuna d'elles (Strzezek i col., 1999, 2000). Segons Gopalkrishnan i col. (1992) i Bartoov i col. (1993) l'augment o disminució del volum i el pH seminal són deguts a alteracions en la composició de fluid seminal, sobretot en el contingut d'aigua, ions i proteïnes procedents de la pròstata, les vesícules seminals i/o les glàndules de Cowper. Els resultats obtinguts en aquest estudi coincideixen amb els aportats per Strzezek i col. (1999, 2000); així doncs, el fotoperíode modifica l'activitat de les glàndules sexuals accessòries, per bé que de moment es desconeix a través de quin mecanisme (Strzezek i col., 2000). De tota manera, existeixen alguns estudis que demostren una absència d'efecte de la durada de la fotofase sobre el volum total de l'ejaculat (Brandt i Diekman, 1985).

L'exposició dels mascles a llum contínua i a foscors absoluta es manifesta en un descens de la concentració espermàtica que es manté fins al segon mes de tractament, observant-se un increment en el tercer mes. L'efecte de la llum sobre la concentració espermàtica és més sever en els mascles exposats a llum contínua i la recuperació més ràpida en els mascles exposats a foscors absoluta. El mateix patró s'ha observat en analitzar la producció espermàtica diària i el nombre de dosis seminals per ejaculat. Existeixen gran controvèrsies sobre l'efecte del fotoperíode en la producció espermàtica dels mascles porcins (Flowers, 1997). Segons Mazzari i col. (1968) els mascles porcins adults exposats a dies llargs mostren una reducció del nombre total d'espermatozoides, mentre que Claus i Weiler (1985) descriuen un augment de la producció d'espermatozoides en incrementar la llum en períodes naturals de dia curt o en disminuir la llum en períodes naturals de dia llarg. La disminució de la producció espermàtica en el primer mes de tractament es correlaciona amb una

adaptació fisiològica dels mascles al canvi de fotoperíode natural a fotoperíode experimental. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts per Andersson i col. (1998) els quals van demostrar que els canvis sobtats en el règim de llum provocaven variacions temporals en l'activitat espermatogènica. La recuperació ràpida de la qualitat seminal dels mascles mantinguts a foscor absoluta indica que l'exposició perllongada a condicions d'obscuritat no afecta la producció testicular, mentre que la no recuperació dels mascles mantinguts a llum contínua indica que existeix una correlació negativa entre il·luminació i activitat testicular.

La melatonina es considera un regulador essencial de l'activitat testicular de moltes espècies (Partonen, 1999). En hàmmsters, reproductors de dia llarg, Horton i Yellon (2001) van observar que els aportos extrínsecs de melatonina en mascles exposats a fotofases curtes indueixen atrofia testicular; d'altra banda, la pinealectomia i les exposicions perllongades de llum estan associades a un increment de la funció gonadal (Aubert i col., 1988). De tota manera, no existeixen dades sobre els efectes concrets de la melatonina en la funció reproductiva del mascle porcí, ni d'altres espècies de mamífers reproductors de dia curt.

La il·luminació contínua i la foscor absoluta no alteren la motilitat i la vitalitat espermàtiques. Segons Brandt i Diekman (1985) no existeix una correlació positiva entre el nombre d'hores de llum i la freqüència d'espermatozoides mòbils de l'ejaculat. La motilitat espermàtica és un dels paràmetres més importants en l'avaluació de la qualitat del semen (Flowers, 1997; Rigau i col., 2001). Des d'un punt de vista funcional, la motilitat està íntimament relacionada amb la capacitat d'obtenir energia dels espermatozoides (Roldan, 1998). En el semen fresc, els espermatozoides obtenen l'energia pel moviment a partir de substrats de naturalesa glucídica que són incorporats al cicle de Krebs (Williams i Ford, 2001; Rigau i col., 2002). A més, els espermatozoides dels mamífers poden formar lactat a partir de glucosa i fructosa (Rigau i col., 2002). De totes

maneres, existeixen grans diferències entre espècies en el tipus de sucres i el metabolisme energètic dels espermatozoides (Jones i Connor, 2000).

La glucosa i la fructosa són presents en el plasma seminal de la majoria dels mamífers, per bé que altres sucres com el sorbitol i la manosa poden també ser detectats (Setchell i Brooks, 1988). En el semen humà la glucosa és essencial per al moviment progressiu dels espermatozoides, per bé que aquest sucre no té cap efecte sobre la seva viabilitat (Williams i Ford, 2001). En els rossegadors la glucosa, però no la fructosa, incrementa les taxes de fertilitat dels espermatozoides (Franer i Herod, 1990). En els gossos el moviment dels espermatozoides varia en funció del contingut de glucosa i fructosa del plasma seminal (Rigau i col., 2001).

Segons Catt i col. (1997) i Jonnes i Connor (2000) el sucre més abundant del plasma seminal de porcí és la fructosa, la qual és utilitzada pels espermatozoides com a font d'energia pel moviment, mentre que la glucosa i el sorbitol són sucres més minoritaris, però que tenen un paper essencial en el manteniment de la viabilitat cel·lular. De tota manera, en el present estudi s'observa que el sorbitol és el sucre majoritari del plasma seminal. Els sucres presents al plasma seminal són aportats, majoritàriament, per les glàndules sexuals accessòries i, més concretament a l'espècie porcina, per les vesícules seminals (Lavon i Bournnell, 1971; McDonald, 1991; Strzezek i col., 2000). Segons Ciereszko i col. (2000) l'activitat de les glàndules sexuals accessòries varia en funció de la raça; així doncs, aquestes diferències entre autors podrien ser ocasionades per l'efecte de la raça, per bé que no es poden descartar altres factors com l'edat, el ritme d'extraccions o el règim nutricional. Per tant, és necessari dissenyar nous experiments a fi de determinar quins són els factors fisiològics i ambientals que regulen l'activitat de les glàndules sexuals accessòries.

Els resultat obtinguts també indiquen que el fotoperíode, malgrat que no altera la concentració de fructosa i sorbitol, provoca una disminució dels nivells de glucosa a l'inici i al final dels tractaments experimentals de llum contínua i de

foscor absoluta. Existeixen poques dades sobre l'efecte de la llum en la composició bioquímica del plasma seminal; probablement el fet que la glucosa sigui el sucre minoritari en la composició del semen de porcí (McDonald, 1991; Martín i de Alba, 1996; Jones i Connor, 2000) determina que la seva sensibilitat al fotoperíode sigui més elevada, de manera que petites variacions en la durada de la fotofase comportin canvis significatius en la seva concentració.

Existeix una correlació entre la motilitat i vitalitat espermàtiques i el contingut de sucres del plasma seminal (Strezezek i col., 2000; Ciereszko i col., 2000; Pérez-Pé i col., 2001a). Les dades obtingudes en el present estudi indiquen que el fotoperíode no altera la motilitat i la vitalitat espermàtiques perquè no modifica el contingut dels sucres majoritaris del plasma seminal. D'altra banda, a partir d'aquests resultats es pot inferir que el fotoperíode no altera la síntesi i secreció de sucres de les vesícules seminals.

El plasma seminal conté una gran diversitat de components bioquímics, alguns dels quals tenen un paper essencial en la regulació de l'activitat dels espermatozoides (Pérez-Pé i col., 2001a). En tots els mamífers les proteïnes del plasma són segregades, majoritàriament, per les vesícules seminals (Lavon i Bournell, 1971; McDonald, 1991; Saiz i col., 1991, 1993; Martín i de Alba, 1996; Carballada i Esponda, 1998; Strzezek i col., 2000; Pérez-Pé i col., 2002), per bé que els seus efectes sobre la funció dels espermatozoides difereix segons les espècies. Així, en toros (Baas i col., 1983) i en bous (Ashworth i col., 1994; Graham, 1994; Maxwell i col., 1997) les proteïnes del plasma seminal són essencials per a la motilitat i la viabilitat dels espermatozoides, mentre que en porcins (Catt i col., 1997) el seu efecte sobre el moviment espermàtic no ha estat demostrat. En humans, la principal funció de les proteïnes del plasma seminal és la de mantenir els espermatozoides en un estat de decapacitació (Cross, 1993).

En porcins, Metz i col. (1990) van demostrar que es produeix l'adsorció d'una gran quantitat de proteïnes plasmàtiques a la superfície dels espermatozoides. Algunes de les proteïnes adsorbides mantenen la integritat de la membrana fins

que es dona el procés de capacitació en el tracte genital femení (Cross, 1993); així doncs, l'eliminació d'aquestes proteïnes és un requisit essencial per a la fecundació (Desnoyers i Manjunath, 1992). Existeixen, a més, altres proteïnes que faciliten el trencament de la membrana durant la reacció acrosòmica i la posterior exocitosi del seu contingut (Pérez-Pé i col., 2001a). Per tant, les proteïnes del plasma seminal de porcí són importants, no només per a l'adquisició de la capacitat fecundant, sinó també per mantenir la viabilitat dels espermatozoides (Pérez-Pé i col., 2001a); en aquest sentit, s'ha demostrat que la presència de residus fosforil·lats de proteïna en el plasma seminal té un efecte protector de la membrana espermàtica i evita la desestabilització dels lípids (Pérez-Pé i col., 2001b). En humans (Sawetawan i col., 1993) i en bovins (Beconi i col., 1993) també s'ha demostrat que les proteïnes del plasma s'uneixen a les proteïnes integrals de la membrana de l'espermatozoide modificant la seva fluïdesa.

En el plasma seminal dels mascles porcins sotmesos a 24, 12 i 0 hores de llum artificial s'han identificat dues bandes de proteïna amb residus fosforil·lats de tirosina, una d'uns 200 kDa i una altra d'entre 85-100 kDa. Jonakova i col. (2000) i Manaskova i col. (2000) van identificar cinc fraccions proteiques diferents en el plasma seminal de porcí (>100, 55, 45, 30 i 5-15 kDa). Segons aquests mateixos autors les fraccions de pes superior a 100 kDa estan constituïdes per agregats de proteïna que pertanyen al grup de les espermadhesines i que interaccionen amb les proteïnes de membrana de l'espermatozoide; les fraccions de pes molecular entre 55 i 100 kDa estan formades per proteïnes monomèriques que mostren afinitat pel colesterol i, sobretot, pels polisacàrids àcids de la zona pelúcida de l'oòcit (Jonaskova i col., 2000; Manaskova i col., 2000). Així doncs, les proteïnes del plasma seminal no només interaccionen amb la membrana de l'espermatozoide i controlen el procés de capacitació, sinó que també faciliten el procés d'unió de l'espermatozoide a la zona pel·lúcida de l'oòcit (Sanz i col., 1993; Calvete i col., 1997; Manaskova i col., 2000).

En els mascles porcins, els canvis en el contingut de proteïna del plasma seminal es manifesten associats a canvis en la morfologia espermàtica, especialment de l'acrosoma i de la membrana plasmàtica (Watson i col., 1981), i a una disminució de la viabilitat i la capacitat fecundant dels espermatozoides com a conseqüència d'anomalies en el procés de capacitació (Fuller i col., 1994; Watson, 1995; Pérez i col., 1996). D'altra banda, en espècies reproductores estacionals s'ha demostrat que durant l'estació no reproductiva es produeix un descens significatiu o l'absència de la majoria de proteïnes del plasma associat a una disminució de la viabilitat i la taxa de fecundació dels espermatozoides (Smith i col., 1999; Pérez-Pé i col., 2001a). Les dades obtingudes en el present estudi indiquen que en els mascles porcins el fotoperíode no afecta el contingut de proteïna dels plasma seminal i, per tant, tampoc sembla alterar el patró de síntesi i secreció de proteïnes de les vesícules seminals.

La membrana plasmàtica dels espermatozoides conté diversos dominis amb una composició i ultraestructura diferent (Friend, 1982; Holt, 1984). Aquests dominis (acrosoma, segment equatorial, regió postacrosòmica, peça intermèdia i cua) tenen funcions diferents (Pérez-Llano i col., 2001). El test de resistència osmòtica de l'acrosoma dóna informació sobre l'estat funcional de l'acrosoma i mostra una correlació positiva amb la fertilitat (Pérez-Llano i col., 2001).

La resistència osmòtica dels acrosomes dels mascles exposats a llum contínua i, en especial, dels mascles exposats a foscor absoluta és inferior a la dels mascles control, encara que s'aprecia una certa recuperació en els mascles exposats a llum constant al llarg dels tres mesos de tractament. L'estabilitat de la membrana plasmàtica i de la membrana acrosòmica de l'espermatozoide depèn, majoritàriament, de la proporció de lípids i proteïnes que es van incorporant al llarg de l'espermioogènesi i de la posterior maduració epididimària i de l'adsorció de proteïnes segregades per les vesícules seminals en el moment de l'ejaculació (Ciereszko i col., 2000). Trudeau i Sanford (1986) van observar que l'estat funcional d'aquestes membranes varia en funció de la temperatura i el

fotoperíode; a més, Zamboni (1992) demostra que diversos factors, entre ells el fotoperíode, poden alterar la seva composició. Els resultats obtinguts indiquen que els fotoperíodes extrems de llum constant i, sobretot, d'absència de llum afecten l'estabilitat de l'acrosoma de l'espermatozoide. Donat que no s'han observat canvis en la composició de proteïna del plasma seminal és probable que les anomalies de la membrana acrosòmica es desenvolupin durant el procés d'espermioïgènesi i/o de maduració epididimària; posteriors estudis a nivell ultraestructural i immunocitoquímic permetran confirmar aquesta hipòtesi.

L'exposició dels mascles a foscor absoluta no altera la morfologia espermàtica dels ejaculats, malgrat que s'observa un augment de la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua en el primer mes, i un augment de la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal i d'espermatozoides amb anomalies en el nombre de cues en el tercer mes. La llum contínua, d'altra banda, provoca un increment de la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal i d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua ja en el primer mes.

Un ejaculat normal de porcí presenta un 90% d'espermatozoides madurs, un 7-8% d'espermatozoides immadurs i un 2-3% d'espermatozoides aberrants (Martín, 1982; Briz i col., 1995; Pinart i col., 1999b; Bonet i col., 1995, 2000). L'augment de la freqüència d'espermatozoides immadurs s'associa a anomalies en el procés de maduració epididimària (Briz i col., 1995, 1996). Les anomalies en el nombre de cues tenen un origen testicular i es desenvolupen en els primers estadis de l'espermioïgènesi (Zamboni, 1992). Les anomalies en la forma de la cua poden tenir un origen epididimari si aquestes afecten la trajectòria de la cua (Briz i col., 1995, 1996) o bé un origen testicular si comporten alteracions en la constitució del flagel a nivell de la regió doblegada (Barth i Oko, 1989; Zamboni, 1992; Haidl i col., 1993). Els resultats obtinguts indiquen que els fotoperíodes extrems afecten el procés d'expulsió de la gota citoplasmàtica i provoquen anomalies en el procés de diferenciació de la cua, tan a nivell testicular com

epididimari, per bé que aquestes anomalies es manifesten a la primera ona espermatogènica i segona ona epididimària en els mascles mantinguts en llum contínua, i a la tercera ona espermatogènica i sisena ona epididimària en els mascles mantinguts en foscor absoluta.

En el present estudi la fertilitat dels mascles exposats a llum es manté en uns valors normals, mentre que la fertilitat dels mascles exposats a condicions de foscor absoluta disminueix un 40% a la tercera ona espermatogènica, coincidint amb el final del tractament. En canvi, la prolificitat no es veu alterada pel règim lluminós en cap de les situacions experimentals. Aquests resultats estan d'acord amb els observats per Chemineau i col. (1999) que descriuen un efecte estimulador dels suplementes de llum sobre la fertilitat dels mascles. Existeix una correlació altament positiva entre la freqüència d'espermatozoides madurs, la vitalitat espermàtica, la motilitat espermàtica i la capacitat fecundant del semen (Dufour i col., 1984; Hugues i Varley, 1984; Dadoune i col., 1988; McDonald, 1991; Claassens i col., 1992; Flowers, 1997; Brahmkstri i col., 1999; Levine, 1999; Levis, 1999; Kumar i Rani, 1999). La prolificitat, en canvi, depèn no només de les característiques del semen, sinó també de l'estat fisiològic de les femelles (Diekman i Greiger, 1986). Les elevades taxes de fertilitat observades, tant en els mascles exposats a llum contínua com en els mascles exposats a foscor absoluta són degudes a que, malgrat que els fotoperíodes extrems afecten la qualitat del semen, la majoria dels paràmetres espermàtics presenten uns valors normals. La disminució de la fertilitat al final de l'exposició dels mascles a foscor absoluta pot estar relacionada amb la reducció del nombre de munes exitoses degut a la pèrdua de libido d'alguns dels mascles del grup.

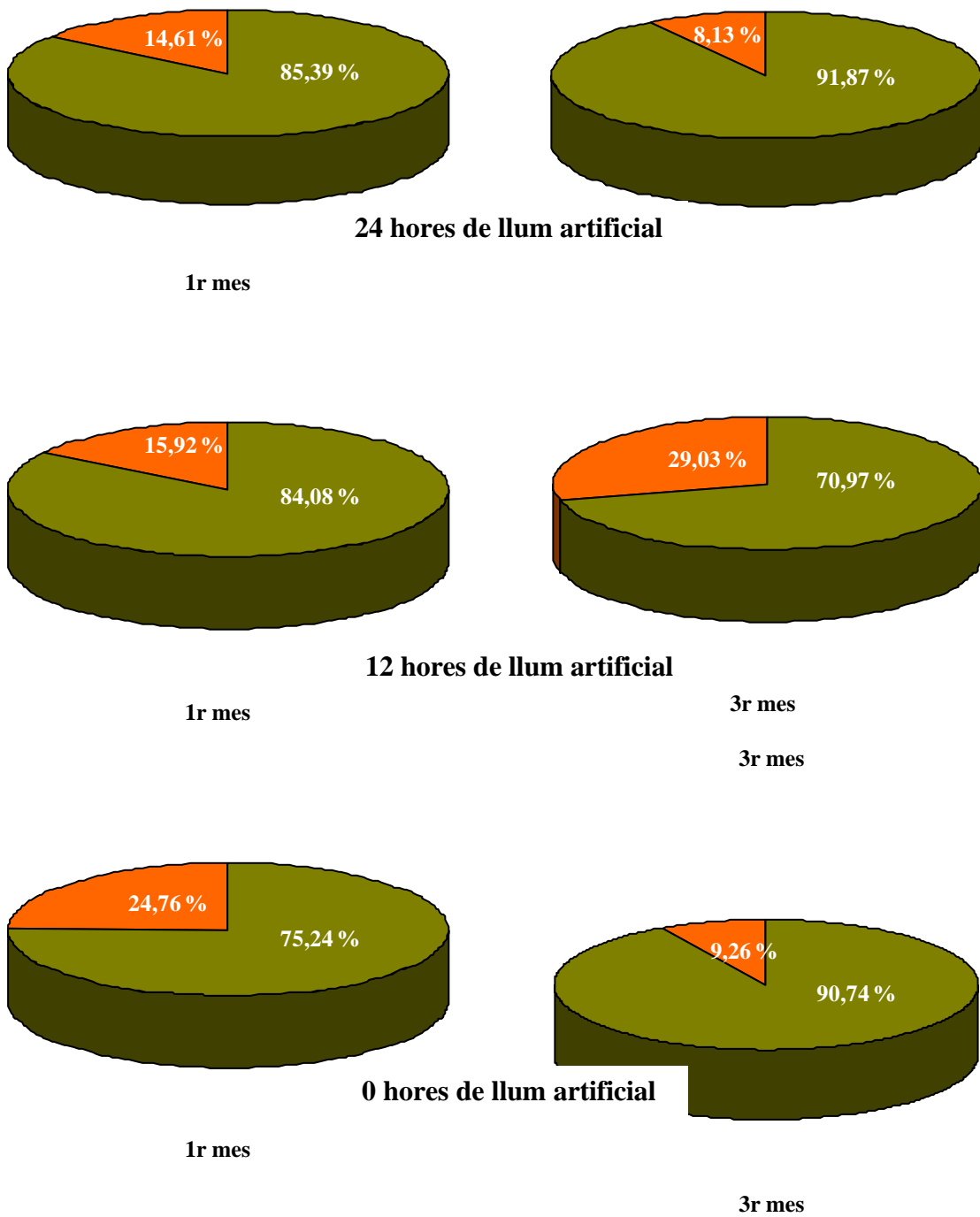
Els resultats d'aquest estudi mostren que el confinament de mascles porcins a condicions de llum contínua comporta un descens de la concentració espermàtica i, per tant, també de la producció espermàtica diària i del nombre de dosis seminals que es poden preparar per ejaculat, de la resistència osmòtica dels acrosomes i de la concentració de glucosa del plasma seminal, i un

augment del volum i el pH seminal, de la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal i de la freqüència d'espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua. D'altra banda, el confinament de mascles porcins a condicions de foscor absoluta es manifesta en un descens de la concentració i la producció espermàtiques, del nombre de dosis seminals, de la resistència osmòtica dels acrosomes, de la fertilitat i de la concentració de glucosa del plasma seminal, i un augment de la freqüència d'espermatozoides immadurs amb gota distal i dels espermatozoides amb anomalies en la forma de la cua.

A partir de les dades obtingudes en aquest treball es pot concloure que la qualitat seminal dels mascles porcins és més sensible a les condicions extremes de llum contínua que a les condicions de foscor absoluta. Aquest patró reproductiu coincideix amb el del seu ancestre i, per tant, malgrat que el porc domèstic és una espècie reproductora anual, durant les estacions amb dies llargs i nits curtes disminueix l'activitat gonadal (Karsh i col., 1994; Aleandri i col., 1996).

De tota manera, a partir d'aquests resultats es fa difícil formular unes condicions de llum idònies en les quals la qualitat del semen sigui elevada. Aquest estudi s'hauria de complementar, doncs, amb nous tractaments exposant els mascles a noves condicions de llum i foscor, a fi de trobar el fotoperíode en el qual la seva activitat reproductiva sigui màxima. Segons Flowers (1997) només determinades condicions de llum i foscor estimulen la secreció de gonadotropines en el porc domèstic, incrementant així l'activitat espermatogènica, mentre que d'altres no modifiquen o disminueixen el patró de secreció hormonal. Per tant, seria interessant de dissenyar nous tractaments experimentals de confinament dels mascles a condicions menys extremes i intermiges i, fins i tot, combinant diferents factors ambientals.

Gràfic 13.2. Sectors que mostren els percentatges de prolificitat dels mascles al primer i tercer mes de cada tractament experimental.



Conclusions

CONCLUSIONS

- *De la qualitat espermàtica de l'ejaculat de mascles exposats a condicions ambientals de primavera i tardor*

1. La qualitat seminal dels mascles porcins difereix entre les estacions de primavera i tardor.
2. El volum total de l'ejaculat, la vitalitat espermàtica i la motilitat espermàtica no difereixen entre les condicions ambientals de primavera i tardor.
3. La morfologia espermàtica no difereix entre les condicions ambientals de primavera i tardor, per bé que es produeix un canvi en els tipus i les freqüències de les anomalies primàries i secundàries presents a l'ejaculat.
4. En condicions ambientals de tardor la concentració espermàtica és un 50% inferior que en condicions ambientals de primavera, mentre que el descens de la producció espermàtica i del nombre de dosis seminals per ejaculat és d'un 37,5%.

5. En condicions ambientals de tardor augmenta la sensibilitat de la membrana acrosòmica als medis hipotònics.

- ***De la qualitat del semen i fertilitat de mascles exposats a condicions experimentals de 24, 12 i 0 hores de llum artificial***

1. El fotoperíode afecta la qualitat seminal dels mascles porcíns, essent aquests més sensibles a les condicions extremes de llum contínua que a les condicions extremes de foscor absoluta.

2. Els fotoperíodes extrems no afecten el volum de l'ejaculat, per bé que provoquen canvis en el pH seminal.

3. El fotoperíode es manifesta en un descens de la concentració espermàtica, de la producció espermàtica i del nombre de dosis seminals en el primer mes d'exposició dels mascles a les condicions extremes:

3.1. en els mascles confinats a foscor absoluta el descens és d'un 40%, per bé que s'observa una recuperació a partir del segon mes de tractament, és a dir, a partir de la segona ona espermatogènica.

3.2. en els mascles exposats a llum contínua el descens és d'un 70% i no es produeix la recuperació d'aquests paràmetres al llarg dels mesos de tractament.

4. Els fotoperíodes extrems de llum contínua i de foscor absoluta no afecten la motilitat espermàtica ni la vitalitat espermàtica.

5. El fotoperíode no altera la resistència osmòtica dels acrosomes en medi isotònic, per bé que provoca un descens d'un 10% de la resistència en medi hipotònic:

5.1. en els mascles exposats a llum contínua es produeix una recuperació a partir del segon mes de tractament.

- 5.2. en els mascles exposats a foscor absoluta no s'observa la recuperació d'aquest paràmetre al llarg dels mesos de tractament.
6. Els fotoperíodes extrems no alteren la morfologia espermàtica, per bé que s'observa respecte dels mascles control un canvi en els tipus i les freqüències de les anomalies primàries i secundàries presents a l'ejaculat.
 7. El sorbitol i la fructosa són els sucres majoritaris del plasma seminal de porcí, mentre que la glucosa és un sucre minoritari.
 8. El fotoperíode no modifica el contingut de fructosa i sorbitol del plasma seminal, per bé que provoca una disminució de la concentració de glucosa; aquesta disminució és més severa en els mascles exposats a llum contínua que en els mascles exposats a foscor absoluta.
 9. El fotoperíode no modifica el contingut de proteïna total del plasma seminal de porcí, ni l'activitat funcional de les proteïnes dependents de la fosforil·lació dels residus de tirosina.
 10. El fotoperíode afecta la fertilitat dels mascles porcins, per bé que no modifica la seva prolificitat.
 - 10.1. en els mascles exposats a llum contínua la fertilitat no es veu alterada al llarg del tractament experimental.
 - 10.2. en els mascles exposats a foscor absoluta la fertilitat disminueix un 30% a partir del tercer mes d'experimentació.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

- Aamdal, J. 1959. *Artificial insemination of pigs in Norway*. Ann. Zootech., (suppl.): 7-13.
- Akingbemi, B.T. i Makinde, M.O. 1995. *Evaluation of some reproductive parameters in the indigenous boar of Zimbabwe*. Onderstepoort J. Vet., Res., 62(1):59-61.
- Albisu, L.M.; Albiac, J. i García-Valdez, P. 1992. *El sector porcino español: consecuencias de la entrada en la Comunidad y perspectivas de futuro*. Rev. Estudios Agrosociales, 162:183-199.
- Aleandri, V.; Spina, V. i Morini, A. 1996. *The pineal gland and reproduction*. Hum. Reprod. Update, 2(3):225-235.
- Andersen, K.; Wiger, R.; Dahl, E.; Torp, T.; Farstad, W.; Krogenaes, A.; McNeilly, A.S.; Paulenz, H. i Ropstad, E. 2001. *Seasonal changes in spermatogenic activity and in plasma levels of FSH, LH and testosterone, and the effect of immunization against inhibin in the male silver fox (Vulpes vulpes)*. Inter. J. Androl., 24:284-294.
- Anderson, L.L. 1993. Pigs. A: Hafez, E.S.E. (ed.). *Reproduction in Farm Animals*, 6ª ed. Lea & Febiger, Philadelphia, pp.343-360.
- Andersson, H.; Rydhmer, L.; Lundström, K.; Wallgren, M.; Anderson, K. i Forsberg, M. 1997. *Influence of artificial light regimens on sexual maturation and boar taint in entire male pigs*. Anim. Reprod. Sci., 51:31-43.

- Andersson, H.; Wallgrem; Rydhmer, L.; Lundström, K.; Anderson, K. i Forsberg, M. 1998. *Photoperiodic effects on pubertal maturation of spermatogenesis, pituitary responsiveness to exogenous GnRH, and expression of boar taint in crossbred boars*. Anim. Reprod. Sci., 54:121-137.
- Andolz, P. i Bielsa, M.A. 1995. Semen Humano. Ed. Garsi. Madrid.
- Araujo, J.F.; Righini, A.S.; Fleury, J.J.; Caldas, M.C.; Costa-Neto, J.B. i Marques, N. 1996. *Seasonal rhythm of semen characteristics of a Brazilian breed ("Mangalarga") stallion*. Chronobiol. Int., 13(6):477-485.
- Arendt, J. 1990. *Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals*. Oxford Rev. Reprod. Biol., Clarendon Press, Oxford, 8:266-320.
- Arendt, J. 1998. *Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology*. Reviews of Reproduction, 3:13-22.
- Arendt, J.; Middleton, B.; Stone, B. i Skeve, D. 1999. *Complex effects of melatonin: evidence for photoperiodic responses in humans*. Sleep, 22(5):625-635.
- Armstrong, J.D.; Britt, J.H. i Cox, N.M. 1986. *Seasonal differences in function of the hypothalamic-hypophysial-ovarian axis in weaned primiparous sows*. J. Reprod. Fert., 78:11-20.
- Asher, G.W. i Berg, D.K.; Beaumont, S.; Morrow, C.J.; O'Neill, K.J. i Fisher, M.W. 1996. *Comparison of seasonal changes in reproductive parameters of adult male European fallow deer and hybrid Mesopotamian x European fallow deer*. Anim. Reprod. Sci., 45(3):201-215.
- Ashworth, P.J.C.; Harrison, R.A.P; Miller, N.G.A.; Plummer, J.M i Watson, P.F. 1994. *Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma*. Reprod. Fertil. Dev., 6:173-180.
- Austin, C.R. i Short, R.V. 1984. Reproduction in Mammals: Hormonal Control of Reproduction. Book núm. 3. 2a ed. Cambridge University Press.
- Axelrod, J. i Wurtman, R.J. 1966. *The Pineal Gland: a biological clock*. Probl. Actuales Endocrinol. Nutr., 10:201-212.
- Babot, D. 2001. Gestión en Empresas de Producción Porcina: Análisis, Diagnóstico y Toma de Decisiones. Editorial de la Universitat de Lleida.

- Ballester, J. 2002. Efectes del tractament amb tungstat sòdic sobre la funció reproductiva en rates diabètiques induïdes amb estreptozotocina. Tesi Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Barboni, B.; Mattioli, M. i Seren, E. 1995. *Influence of progesterone on boar sperm capacitation*. J. Endocrinol., 144(1):13-18.
- Bardasano, J.L. 1979. La Glándula Pineal. Ediciones Blume. Madrid.
- Barth A.D. i Oko R.J. 1989. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press. Ames. pp.285.
- Bartoov, B.; Eltes, F.; Pansky, M.; Lederman, H.; Caspi, E. i Soffer, Y. 1993. *Estimating fertility potential via semen analysis data*. Hum. Reprod., 8:65-70.
- Basurto-Kuba, V.M. i Evans, L.E. 1981. *Comparison of sperm-rich fractions of boar semen collectes by electroejaculation and the gloved-hand technique*. J. Am. Med. Assoc., 178(9):985-986.
- Berger, T.; Mahone, J.P.; Svoboda, G.S.; Metz, K.W. i Clegg, E.D. 1980. *Sexual maturation of boars and growth of swine exposed to extended photoperiod during decreasing natural photoperiod*. J. Anim. Sci., 51:672-678.
- Berger, T. i col. 1996. *Porcine sperm fertilizing potential in relationship to sperm functional capacities*. Anim. Reprod. Sci., 44(4):231-239.
- Bilinska, B.; Schmol-Fraczek, B.; Kotula, M. i Carreau, S. 2001. *Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry*. Mol. Cel. Endocrinol., 178:189-198.
- Biswas, R. i col. 1996. *Protection of testicular activity by continous light in rats treated with lithium*. Med. Sci. Res., 24(5):297-298.
- Bittman, E.L.; Jetton, A.E.; Villalba, C. i Devries, G.J. 1996. *Effects of photoperiod and androgen on pituitary function and neuropeptide staining in Siberian hamstes*. Am. J. Physiol., 271(1 Pt 2):64-72.
- Blasi, C.; Briz, J. 1990. *La estructura productiva del sector porcino es España*. Rev. Estudios Agrosociales, 153:191-217.
- Bollinger, A.L.; Wilson, M.E.; Pusateri, A.E.; Green, M.L.; Martin, T.G. i Diekman, M.A. 1997. *Lack of a nocturnal rise in serum concentrations of melatonin as gilts attain puberty*. J. Anim. Sci., 75(7):1885-1892.

- Bonadonna, T. 1989. Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Tomo II. Hemisferio Sur, S.A., Buenos Aires.
- Bonet, S.; Briz, M. i Fradera, A. 1991. *The sperm quality and fertility of boars after two different ejaculation frequencies*. Scientia gerund., 17:77-84.
- Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Camps, R.; Fradera, A. i Casadevall, M. 1995. *Light microscopy characterization of sperm morphology*. Microscopy and Analysis, 9:29-31.
- Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N. i Badia, E. 2000. Morfología Espermática en Porcino. Ed. Institut d'Estudis Catalans.
- Borg, K.E.; Lunstra, D.D. i Christenson, R.K. 1993. *Semen characteristics, testicular size, and reproductive hormone concentrations in mature duroc, meishan, fengjing, and minzhu boars*. Biol. Reprod., 49(3):515-521.
- Bradford, M.M. 1976. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding*. Anal. Biochem., 72:248-254.
- Brahmkshtri, B.P.; Edwin, M.J.; John, M.C.; Nainar, A.M. i Krishnan, A.R. 1999. *Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro*. Anim. Reprod. Sci., 54:159-168.
- Brandt, K.E. i Diekman, M.A. 1985. *Influence of supplemental lighting on serum LH, testosterone and semen quality in prepubertal and postpubertal boars*. Anim. Reprod. Sci., 8:287-294.
- Brandt, K.E.; Diekman, M.A.; Green, M.L. i Malayer, J.R. 1986. *Lack of circadian rhythm in serum concentrations of melatonin in prepubertal gilts*. J. Anim. Sci., 63, Suppl., 1:356.
- Brandt, K.E.; Diekman, M.A.; Grieger, D.M. i Moss, G.E. 1990. *Effect of supplemental lighting on puberty, follicular development, pituitary and serum concentrations of LH and hypothalamic content of GnRH in gilts*. Anim. Prod., 51:365-373.
- Briz, M.D. 1994. Anàlisi microscòpica de l'esperma ejaculada i de la maduració epididimària dels espermatozoides de *Sus domesticus*. Tesi Doctoral. Universitat de Girona.
- Briz, M.; Bonet, S.; Pinart, E. i Camps, R. 1996. *Sperm malformations throught the boar epididymal duct*. Anim. Reprod. Sci., 43:221-239.

- Brzezinska-Slebodzinska, E.; Slebodzinski, A.B. i Krysin, E. 1995. *Amniotic and allatoic fluid concentrations of thyroxine, 3, 3', 5'-triiodothyronine, 3, 3'-diiodothyronine and 3', 5'-diiodothyronine in the pig during the period of gestation.* J. Endocrinol., 147(2):245-251.
- Brzezinska-Slebodzinska, E.; Slebodzinski, A.B. i Styczynska, E. 1998. Stimulatory effect of melatonin on the 5'-monodeiodinasa activity in the liver, kidney, and brown adipose tissue during the early neonatal period of the rabbit. J. Pineal res., 24(3): 137-141.
- Burnett, W.N. 1981. *Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins.* J. Anal. Biochem., 112:195-203.
- Buxadé, C.C. 1984. Ganado Porcino. Sistemas de Explotación y Técnicas de Producción. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Buzzell, G.R.; Hida, A.; Fu, S. i Seyama, Y. 1997. *Effect of the photoperiod in modulating the androgenic control of 1-alkyl-2,3-diacylglycerol composition in the harderian gland of the golden hamster, Mesocricetus auratus.* J. Exp. Zool., 277(2):99-105.
- Cagnacci, A. i Vole, A. 1996. *Influence of melatonin and photoperiod on animal and human reproduction.* J. Endocrinol. Invest., 19(6):382-411.
- Calvete, J.J.; Raida, M.; Gentzel, M.; Urbanke, C.; Sanz, L. I Topfer-Petersen, E. 1997. *Isolation and characterization of heparin and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1.* FEBS Lett, 407(2):201-206.
- Calvo, A.; Bustos-Obregón, E. i Pastor, L.M. 1997. *Morphological and histochemical changes in the epididymis of hamsters (Mesocricetus auratus) subjected to short photoperiod.* J. Anat., 191:77-88.
- Calvo, A.; Pastor, L.M.; Bonet, S.; Pinart, E. i Ventura, M. 2000. *Characterization of the glycoconjugates of boar testis and epididymis.* J. Reprod. Fertil., 120:325-335.
- Cameron, R.D.A. 1980. *The effect of elevated ambient temperature on spermatogenesis in the boar.* J. Reprod. Fert., 59:173-179.
- Cameron, R.D.A. 1982. Factors influencing semen production and quality in boars reared in a subtropical environment, Ph. D. Thesis, Univ. Qld, Brisbane.

- Cameron, R.D.A. 1985. *Factors influencing semen characteristics in boars*. Aust. Vet. J., 62(9):293-297.
- Cameron, R.D.A. 1985. *Measurement of semen production rates of boars*. Aust. Vet. J., 62:301-304.
- Catt, S.L.; O'Brien, J.K.; Maxwell, W.M.C. i Evans, G. 1997. *Assessment of ran and boar spermatozoa during cell-sorting by flow citometry*. Reprod. Domest. Anim., 32:251-258.
- Chemineau, P.; Berthelet, X.; Malpoux, B.; Guérin, D.; Guillaume, D. i Pelletier, J. 1991. *Photopériode, Mélatonine et maîtrise de la reproduction des mamifères d'élevage*. Bull. des G.T.V., 1:21-31.
- Cherry, J.A. 1987. *The effect of photoperiod on development of sexual behaviour and fertility in golden hamster*. Physiol. Behav., 39(4):521-526.
- Christenson, R.K. 1973. *Synchronization of estrus and ovulation in superovulated gilts*. J. Anim. Sci., 36(5):914-918.
- Christenson, R.K. 1981. *Influence of confinement and season of the year on puberty and oestrous activity in gilts*. J. Anim. Sci., 52:821-830.
- Ciereszko, A.; Ottobre, J.S.; Glogowski, J. 2000. *Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars*. Anim. Reprod. Sci., 64:89-96.
- Clarke, I.J. i Tilbrook, A.J. 1992. *Influence of non-photoperiodic environmental factors on reproduction in domestic animals*. Anim. Reprod. Sci., 28:219-228.
- Claus, R.; Weiler, U. i Wagner, H.G. 1984. *The influence of age and season (light) on boar*. In: Courot, M. (ed). *The Male in Farm Animal Reproduction*. Martinus Nijhoff Publishers.
- Claus, R. i Weiler, U. 1985. *Influence of light and photoperiodicity on pig prolificacy*. J. Reprod. Fert., Suppl., 33:185-197.
- Claus, R.; Weiler, U. i Wagner, H.G. 1985. *Photoperiodic influences on semen characteristics and libido*. Zbi. Vet. Med. A., 32:99-109.
- Claus, R.; Weiler, U. i Wagner, H.G. 1985. *Photoperiodic influences on reproduction of domestic boars. II. Light influences on semen characteristics and libido*. Zentralbl Veterinarmed A., 32(2):99-109.
- Clay, C.M.; Squires, E.L.; Amann, R.P. i Pickett, B.W. 1987. *Influences of season and artificial photoperiod on stallions testicular size, seminal characteristic and sexual behaviour*. J. Anim. Sci., 62(2):517-525.

- Colenbrander, B. i Kemp, B. 1990. *Factors influencing semen quality in pigs*. J. Reprod. Fert., Suppl., 40:105-115.
- Colenbrander, B; Feitsma, H. i Grooten, H.J. 1993. *Optimiziy semen production for artificial insemination in swine*. J. Reprod. Fert., 48:207-215.
- Coromina, E.; Casacuberta, X. i Quintana, D. 2000. El Treball de Recerca. Procés d'Elaboració, Memòria escrita, Exposició Oral i Recursos. Eumo Editorial. Vic.
- Cosgrove, J.R. i col. 1992. *Maturational changes in gonadotrophin secretion: the LH response to realimentation and a nocturnal increment in LH secretion of feed-restricted prepubertal gilts*. J. Reprod. Fert., 98:293-300.
- Crabo, B.G. 1985. Post-testicular sperm maturation and its importance to deep freezing of boar semen. Proceedings of the International Conference on Deep Freezing of Boar Semen (Uppsala), pp. 25-27.
- Cross, N.L. 1993. *Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm*. Mol. Reprod. Dev., 35:316-323.
- Cupps, P.T. 1991. Reproduction in Domestic Animals (4a ed). New York, N.Y.: Academic Press Inc.
- Dadoune, J.P. i Demoulin, A. 1993. Structure and function of the testis. A: Thibault, C.; Levausser, M.C. i Hunter, R.H.F. (eds). Reproduction in Mammals and Man. Ellipses. 227-256.
- Darwin, C. 1859. The Origin of Species. John Murray. London. Now available by Penguin Group. London.
- Dawson, A.; Pitt, R. i Peters, A.R. 1998. Seasonality and Reproduction, 15:327-342. A: Wiseman, J.; Varley, M.A.; Chadwick, J.P. Progress in Pig Science. Nottingham University Press. Nottingham.
- Daza, A. 1992. Manejo de la Reproducción en el Ganado Porcino. Ed. Aedos. Barcelona.
- De Boer, H. i Hacker, R.R. 1986. *Circadian rhythm of melatonin, thyroxine and prolactin in sows*, Can. J. Anim. Sci., 66:1189.
- De Kretser, D.M. i Kerr, J.B. 1994. The cytology of the testis. A: Knobil, E. i Neill, J.D. (eds). The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York. 1177-1290 pp.

- De Rooij, D.G.; Schrans-Stassen, B.; Van Pelt, A.M.M.; Shuttlesworth, G.A.; Miestrich, M.L. Okahe, M. I Nishimune, Y. 2000. Regulation of the differentiation of the undifferentiated spermatogonia. A: Golberg, E. (ed). The Testis. Stem Cell to Sperm Function. Springer-Verlag. New York, Inc. 43-54 pp.
- Delgadillo, J.A.; Hochereau de Reviere, M.T.; Daveau, A. i Chemineau, P. 1995. *Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (Capra hircus).*, *Reprod. Nutr. Dev.*, 35(5):549-558.
- Demas, G.E.; Klein, S.L. i Nelson, R.J. 1996. *Reproductive and immune responses to photoperiod and melatonin are linked in Peromyscus subspecies.* *J. Comp. Physiol.*, 179(6):819-825.
- Desnoyers, L.; Manjunath, P. 1992. *J. Biol. Chem.*, 267.
- Diekman, M.A. i Greiger, D.M. 1986. *Influence of varying intensities of supplemental lighting during decreasing daylengths on puberty in gilts.* *Anim. Reprod. Sci.*, 16:295-301.
- Diekman, M.A. i col. 1990. *Environment and Reproduction*, 17:319-331.
- Diekman, M.A.; Clapper, J.A.; Green, M.L. i Stouffer, D.K. 1991. *Reduction in age of puberty in gilts consuming melatonin during decreasing or increasing daylength.* *J. Anim. Sci.*, 69:2524-2531.
- Diekman, M.A.; Brandt, K.E.; Green, M.L.; Clapper, J.A. i Malayer, J.R. 1992. *Lack of nocturnal rise of serum melatonin in prepubertal gilts.* *Dom. Ani. Endocrinol.*, 9:161-167.
- Diekman, M.A. i Green, M.L. 1997. *Serum concentrations of melatonin in prepubertal or postpubertal gilts exposed to artificial lighting or sunlight.* *Theriogenology*, 47:923-928.
- Dirks, C. 1989. Fertility disorders in the boar. *Scheweine-Zucht und Scweine-Mast*, 37:281-284.
- Dobao, M.T.; Rodríguez, J. i Silio, L. 1983. *Seasonal influence on fecundity and litter performance characteristics in Iberian pigs.* *Livest. Prod. Sci.*, 10:601-610.
- Dott, H.M. i Foster, G.C. 1972. *A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential life dead stain.* *J. Reprod. Fertil.*, 29:443.

- Driancourt, M.A.; Royère, D.; Hédon, B. I Levasseur, M.C. 1993. Oestrous and menstrual cycles. A: Thibault, C.; Levasseur, M.C. i Hunter, R.H.F. (eds). *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. 589-604 pp.
- Ducos, A. i Bidanel, J.P. 1996. *Genetic correlations between production and reproductive traits measured on the farm, in the Large White and French Landrace pig breeds*. J.Anim. Breed Genet., 113:493-504.
- Dufour, J.J.; Fahmy, M.H. i Minvielle, F. 1984. *Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long and short breeding season*. J. Anim. Sci., 58(2):416-422.
- Dyce, K.M.; Sack, W.O. i Wensing, C.J.G. 1999. *Anatomía Veterinaria*. 2a ed. Ed. McGraw-Hill-Interamericana.
- Ebling, F.J.P. i Hastings, M.H. 1992. *The neural basis of seasonal reproduction*. Ann. Zootech., 41:239-246.
- Ebling, F.J.P. i col. 1994. *Photoperiodically induced changes in glutamatergic stimulation of LH secretion in male Syrian hamsters: role of circulating testosterone and endogenous opioids*. Gen. Comp. Endocrinol., 96(1):50-62.
- Edmonds, K.E.; Stetson, M.H. i col. 1993. *Effect of photoperiod on gonadal maintenance and development in the marsh rice rat. (Oryzomys palustris)*. Gen. Comp. Endocrinol., 92(2):281-291.
- Edmonds, K.E. i Stetson, M.H. 1995. *Pineal gland and melatonin affect testicular status in the adult marsh rice rat (Oryzomys palustris)*. Gen. Comp. Endocrinol., 99(3):265-274.
- El-Alamy, M.A.; Foote, R.H. i Hare, E. 2001. *Sperm output and hormone concentrations in finn and dorset rams exposed to long and short day lighting*. Theriogenology, 56:839-854.
- Esponda, P. 1985. *Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. Servicio Editorial Universidad del País Vasco.
- Evenson, D.P.; Darzynkiewicz, Z. i Melamed, M.R. 1980. *Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility*. Science, 210:1131-1133.
- Evenson, D.P., Parks, J.E.; Kaproth, M.T. i Jost, L.K. 1993. *Rapid determination on sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry*. J. Dairy Sci., 76(1):86-94.
- Everett, R.W.; Bean, B. i Foote, R.H. 1978. *Sources of Variation of Semen Output*. J Dairy Sci., 61:90-95.

- Fernandez Abella, D. i Villegas, N. 1992. *Effect of melatonin on semen quality in spring and summer (sheep)*. Univ. Republica, 2(1):51-57.
- Flowers, B.; Cantley, T.C.; Martin, M.J. i Day, B.N. 1989. *Effect of elevated ambient temperatures on puberty in gilts*. J. Anim. Sci., 67:779-784.
- Flowers, W.L. 1997. *Management of boars for efficient semen production*. J. Reprod. Fertil. Suppl., 52:67-78.
- Flowers, W.L. i Esbenshade, K.L. 1993. *Optimizing management of natural and artificial matings in swine*. J. Reprod. Fertil. Suppl., 48:217-228.
- Foote, R.H. 1978. *Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions*. J. Anim. Sci., 47 Suppl., 2:1-11.
- Fournier-Delpech, S. I Thibault, C. 1993. Acquisition of sperm fertilization. A: Thibault, C.; Levasseur, M.C. i Hunter, R.H.F. (eds). *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. 257-280.
- Foxcroft, G.R. i col. 1996. *Semen dilution for assesment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems*. Theriogenology, 46(8):1325-1337.
- Frungieri, M.B.; González-Calvar, S.I. i Calandra, R.S. 1996. *Influence of photoinhibition on GABA and glutamic acid levels, and on glutamate descarboxylase activity in the testis and epididymis of the golden hamster*. Int. J. Androl., 19(3):171-178.
- Fuentes, P.A.R. i col. 1993. *Effect of season on semen traits of boars in the tropics*. *Zootecnia Tropical*, 10(1):51-64.
- Furuta, I.; Porkka-Heiskanen, T.; Scarbrough, K.; Tapanainen, J.; Turek, F.W. i Hsueh, A.J. 1994. *Photoperiod regulates testis cell apoptosis in Djungarian hamsters*. Biol. Reprod., 51(6):1315-1321.
- García-Artiga, C.; Fontanillos, J.C.; Pérez., J.; García-Cuenca, I., Martín, S. i Pérez-García, T. 1994. *Técnicas de Tinción Espermática*. *Tratado de Ganado Porcino (Porci)*, 21:11-18.
- Garner, D.L. i Hafez, E.S.E. 1989. *Espermatozoides y Plasma Seminal*. A: Hafez, E.S.E. (ed), *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Interamericana-McGraw-Hill, México. Capt.9, pp 205-226.
- Garner, D.L. i Hafez, E.S.E. 1996. *Espermatozoides y plasma seminal*. A: Hafez, E.S.E. (ed). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Interamericana McGraw-Hill. 158-179 pp.

- Gaston, S. i Menaker, M. 1967. *Photoperiodic control of hamster testis*. Science, 158(803):925-928.
- Gil, J. 1999. *Mejora de los parámetros reproductivos en porcino mediante la adición de prostaglandina F2a en la dosis seminal*. Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc)., 186:64-75.
- Glossop, C.E. i Newstead, R.A. 1987. *Oestrone sulphate for pregnancy diagnosis in sows*. Veterinary Record, 120:71.
- Glossop, C.E.; Foulkes, J.A.; Whitwoth, A. i Cornwell, E. 1989. *Use of an on-farm progesterone assay kit to determine pregnancy in sows*. Vet. Rec., 124(5):115-117.
- Goldman, B.D. 1999. *The circadian timing system and reproduction in mammals*. Steroids, 64(9):679-685.
- Goldman, B.D. 2001. *Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement*. J. Biol. Rhythms, 16(4):283-301.
- Gopalkrishnan, K.; Hinduja, I.N. i Kumar, A. 1992. *Volume of semen as a parameter of its quality*. Indian J. Med. Res., 96:361-365.
- Gordon, I. 1998. *Reproducción Controlada del Cerdo*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Gorman, M.R. 1995. *Seasonal adaptations of Siberian hamsters. I. Accelerated gonadal and somatic development in increasing versus static long day lengths*. Biol. Reprod., 53(1):110-115.
- Gorman, M.R. i Zucker, I. 1995. *Seasonal adaptations of Siberian hamsters. II. Pattern of hange in daylength controls annual testicular and body weight rhythms*. Biol. Reprod., 53(1):116-25.
- Gorman, M.R.; Yellow, S.M. i Lee, T.M. 2001. *Temporal reorganization of the suprachiasmatic nuclei in hamsters with split circadian rhythms*. J. Biol. Rhythms, 16(6):541-551.
- Graham, J.K. 1994. *Effect of seminal plasma on the motility of the epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process*. Theriogenology, 41:1151-1162.
- Gray, J. 1958. *The movement of the spermatozoa of the bull*. J.Exp. Biol., 35:96.

- Green, M.L.; Clapper, J.A. i Diekman, M. 1999. *Serum concentrations of melatonin during scotophase and photophase in 3, 4, 5 and 6 month old gilts and barrows*. Anim. Reprod. Sci., 57:99-110.
- Griffith, M.H. i Minton, J.E. 1992. *Effect of light intensity on circadian profiles of melatonin, prolactin, ACTH, and cortisol in pigs*. J. Anim. Sci., 70:492-498.
- Guerin, M.V.; Napier, A.J. i Matthews, C.D. 1994. *Effect of exogenous melatonin and extending the dark period at dusk before the summer solstice on the onset of oestrus in Romney Marsh ewes*. J. Reprod. Fertil, 101:145-150.
- Guerin, M.V.; Deed, J.R. i Matthews, C.D. 2000. *The coincidence of light and melatonin with a specific phase of the circadian pacemaker is important for the timing of seasonal breeding in the ewe*. J. Biol. Rhythms, 15 (6):515-523.
- Gulevich, R.G.; Klotchkov, D.V.; Ivanova, L.N. i Osadchuk, L.V. 1995. *Gonadal function in mink under artificial photoperiods*. J. Reprod. Fertil., 103(1):147-152.
- Gunduz, B. 1994. *Effects of photoperiod, pinealectomy and melatonin implants on testicular development in juvenile Siberian hamsters. (Phodopus sungorus)*. Biol. Reprod., 51(6):1181-1187.
- Gunduz, B. 2002. *Daily rhythm in serum melatonin and leptin levels in the Syrian hamster (Mesocricetus auratus)*. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol, 132(2):393-401.
- Hacker, R.R.; King, G.J.; Ntunde, B.N. i Narendrau, R. 1979. *Plasma oestrogen, progesterone and other reproductive responses of gilts to photoperiods*. J. Reprod. Fert., 57:447-451.
- Hafez. E.S.E. 1996. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 3a ed. Interamericana-McGraw-Hill. México.
- Haidl, G.; Badura, B.; Hisch, K.D.; Ghyczy, M.; Carreib, I i Schill, W.B. 1993. *Disturbances of sperm flagella due to failure of epididymal maturation and their possible relationship to phospholipids*. Hum. Reprod., 8:1070-1073.
- Hancock, J.L. i Howell, G.J.L. 1959. *The collection of boar semen*. Vet. Rec.,71:664-665.
- Harayama, H.; Kanda, S. i Kato, S. 1992. *Influence of season on characteristics of epididymal and ejaculated semen in Meishar boars*. Theriogenology, 38:491-500.

- Harrison, R.P.A. 1997. *Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility*. J. Reprod. Fertil. Suppl., 52:195-211.
- Hecht, N.B. 2000. Spermatogenesis after the millenium. A: Golberg, E. (ed). *The Testis. Stem Cell to Sperm Function*. Springer-Verlag. New York, Inc. 10-20 pp.
- Hoagland, T.A. i Diekman, M.A. 1982. *Influence of supplementall lighting during increasing daylength on libido and reproductive hormones in prepuberal boars*. J. Anim. Sci. 55:1483-1489.
- Hoffmann, B. i Landeck, A. 1999. *Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion*. Anim. Reprod. Sci., 57:89-98.
- Holt, C.; Holt, W.V.; Moore, H.D.; Reed, H.C. i Curnock, R. M. 1997. *Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two feertility trials*. J. Androl., 18(3):312-323.
- Howles, C.M.; Webster, G.M. i Haynes, N.B. 1980. *The effect of rearing under a long or short photoperiod on testis growth, plasma testosterone and prolactin concentrations, and the development of sexual behaviour in rams*. J. Reprod. Fertil., 60(2):437-447.
- Houpt, T.R. 1983. *The sites of action of cholecystokinin in decreasing meal size in pigs*. Phisiol. Behav.; 31(5):693-698.
- Huang, Y.T. i Johnson, R.K. 1996. *Effect of selection for size of testes in boars on semen and testis traits*. J. Anim. Sci. 74(4):750-760.
- Huang, S.Y.; Kuo, Y.H.; Lee, Y.P.; Tsou, H.L.; Lin, E.C.; Ju, C.C. i Lee, W.C. 2000. *Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars*. Anim. Reprod. Sci., 63(3-4):231-240.
- Hughes, P.E. i Varley, M.A. 1984. *Reproducción del Cerdo*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Jainudeen, M.R. i Hafez, E.S.E. 1996. *Diagnóstico de preñez*. A: Thibault, C.; Levausser, M.C. i Hunter, R.H.F. (eds). *Reproduction e <inseminación Artificial en Animales*. Interamericana McGraw-Hill. 418-431 pp.
- Jensen, A.H. 1970; Yen, J.T.; Gehring, M.M.; Baker, D.H.; Becker, D.E. i Harmon, B.G. 1984. *Effects of space restriction and management of female swine*. J. Anim. Sci, 31:745-750.

- Jeyendran, R.S.; Van der Ven, H.H.; Reid, D.; Pérez-Peláez, P.; Diedrich, K. i Zaneveld, L.J.D. 1985. *The hypoosmotic swelling (HOS) test as an indicator of the fertilizing capacity of human spermatozoa, current clinical as basic investigations*. A: Acog, 33 Clinical Meeting. New York, Elsevier.
- Johnson, R.K.; Zimmerman, D.R.; Lamberson, W.R. i Sasaki, S. 1985. *Influencing prolificacy of sows by selection for physiological factors*. J. Reprod. Fertil. (suppl.), 33:139-149.
- Johnson, L. 1991. *Seasonal differences in equine spermatocytogenesis*. Biol. Reprod., 44:284-291.
- Johnson, L.A.; Aalbers, J.G.; Willems, C.M.; Rademaker, J.H. i Rexroad, C.E. 1982. *Use of boar spermatozoa for artificial insemination. III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltville liquid and Kiev extenders for three days at 18 C*. J. Anim. Sci., 1982, 54(1):132-136.
- Johnston, L.A.; Armstrong, D.L. i Brown, J.L. 1994. *Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (Panthera uncia)*. J. Reprod. Fert., 102(1):229-236.
- Jonakova, V.; Manaskova, P.; Kraus, M.; Liberda, J. i Ticha, M. 2000. *Sperm surface proteins in mammalian fertilization*. Mol. Reprod. Dev., 56(2 Suppl):275-277.
- Jondet, R. 1971. *Influence de l'intervalle récolte-dilution sur le pouvoir fécondant du sperme de taureau*. Il Late, 3:169.
- Jones, A.R. i Bubb, W.A. 2000. *Substrats for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa*. J. Reprod. Fertil., 119:129-135.
- Karsh, F.J.; Bittman, E.L.; Foster, D.L.; Goodman, R.L.; Legan, S.J. i Robinson, J.E. 1984. *Neuroendocrine basis of seasonal reproduction*. Rec Prog in Horm. Res., 40:185-232.
- Keel, B.A. i Webster, B.W. 1990. *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. CRC Press. Boca Ratón.
- Kennaway, D.J. i Hugel, H.M. 1992. *Mechanisms of action of melatonin within the central nervous system*. Anim. Reprod. Sci., 30:45-65.
- Kennaway, D.J.; Voultios, A.; Varcoe, T.J. i Moyer, R.W. 2002. *Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 282(2):R358-65.

- Kennedy, B.W. i Wilkins, J.N. 1984. *Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination*. Can. J. Anim. Sci., 64:833-843.
- King, G.J. i McPherson, J.W. 1973. *A comparison of two methods for boar semen collection*. J. Anim. Sci., 36:563-565.
- King, G. 1993. *Reproduction in Domesticated Animals*. Ed. Elsevier Science.
- Knobil, E. i Neill, J.D. 1994. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 2 2a ed. Raven Press. New York.
- Koh, T.J.; Crabo, B.G.; Tsou, H.L.; Graham, E.F. 1976. *Fertility of liquid boar semen as influenced by breed and season*. J. of Anim. Sci., 42(1):138-144.
- Koketsu, Y.; Dial, G.D. i King, V.L. 1997. *Influence of various factors on farrowing rate on farm using early weaning*. J. Anim. Sci., 75(10):2580-2587.
- Korytko, A.I.; Marcelino, J. i Blank, J.L. 1995. *Differential testicular responses to short daylength in deer mice are reflected by regional and morphological differences in the GnRH neurona system*. Brain Res., 685(1-2):135-142.
- Kumar, V. i Rani, S. 1999. *Light sensitivity of the photoperiodic response system in higher vertebrates: wavelength and intensity effects*: J. Exp. Biol, 37(11):1053-1064.
- Kunavongkrit, A. i Prateep, P. 1980. *Seasonal effect on boar semen quality*. Proceedings IPUS, 441.
- Kvist, U. I Björndahl, L. (editors). 2002. *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monographs. Oxford University Press.
- Laemmli, U.K. 1970. *Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227:680-685.
- Larkin, J.E.; Jones, J. i Zucker, I. 2002. *Temperature dependence of gonadal regression in Syrian hamsters exposed to short day lengths*. Am. J. physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 282(3):R744-752.
- Larsson, K. i col. 1984. *Seminal changes in boars after heat stress*. Acta Vet. Scand., 25(1):57-66.
- Lee, K.H.; Diekman, M.A.; Brandt, K.E.; Grieger, D.M. i Allrich, R.D. 1987. *Hormonal patterns of boars exposed to natural or supplemental lighting during pubertal development*. J. Anim. Sci. 64:1110-1116.

- Lee, K-H.; Diekman, M.A.; Moss, G.E. i Allrich, R.D. 1987b. *Pituitary gonadotropins hypothalamic gonadotropin-releasing hormone, and testicular trait of boars exposed tp natural or supplemental lighting during pubertal development*. *Bio. Reprod.*, 36:1164-1169.
- Legan, S.J. i Robinson, J.E. 1984. *Neuroendocrine basis of seasonal reproduction*. *Rec. Prog. in Horm. Res.*, 40:185-232.
- Leman, A.D. 1976. *Boar management*. *Vet. Rec.*, 98:457-459.
- Levine, R.J. 1999. *Seasonal variation of semen quality and fertility*. *Scand. J. Work Environ Health*, 25(suppl.) 1,:34-37; discussion 76-78.
- Levis, D.G. 1997. *Production Manegement: maneging postpubertal boars for optimum fertility*. *Swine Med.* 17-23 pp.
- Levis, D.G. 1999. *Mejora de la fertilidad del verraco*. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc)*, 193:32-46.
- Ligr, M.; Ron, C. i Natr, L. 1995. *Calculating of the photoperiod length*. *Comput. Appl. Biosci.*, 11(2):133-139.
- Lincoln, G.A. 1992. *Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep*. *Anim. Reprod. Sci.*, 28:204-217.
- Lincoln, G.A.; Clarke, I.J. i Sweeney, T. 1996. *"Hamster-like" cycles in testicular size in the absence of gonadotrophin secretion in HPD rams exposed to long-term changes in photoperiod and treatment with melatonin*. *J. Neuroendocrinol.*, 8(11):855-866.
- Llano, B.P. i col. 1994. *Influence of photoperiod on the secretion of testosterone as a response to sexual stimulus in male goats*. *Theriogenology*, 42(1):127-135.
- Louis, G.F.; Lewis, A.S.; Weldon, W.C.; Ermer, P.M.; Miller, P.S.; Kittok, R.J. i Stroup, W.W. 1994. *The effect of energy and protein intakes on boar libido, semen characteristics and plasma hormone concentrations*. *J. Anim. Sci.*, 72(8):2051-2060.
- Love, R.J. 1978. *Definition of a seasonal infertility problem in pigs*. *Vet. Rec.*, 103:443-446.
- Love, R.J. 1981. *Seasonal infertility in pigs*. *Vet. Rec.*, 109:407-409.
- Love, R.J.; Evans, G. i Klupiec, C. 1993. *Seasonal effects on fertility in gilts and sows*. *J. Reprod. Fert.*, 48:191-206.

- Ludwig, G. i Frick, J. 1990. *Spermatology: Atlas and Manual*. Ed. Springer-Verlag. New York.
- Luke, M.C. i Coffei, D.S. 1994. *The male sex accessory tissues: structure, androgen action and physiology*. A: Knobil, E. i Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. 1435-1488 pp.
- Mahone, J.P.; Berger, T.; Clegg, E.D. i Singleton, W.L. 1979. *Photoinduction of puberty in boars during naturally occurring short day lengths*. *J. Anim. Sci.*, 48(5):1159-1164.
- Malmgren, L. 1990. *Experimentally induced testicular alterations in boars: hormonal changes in mature and peripubertal boars*. *Acta Vet. Scand.*, 31(1):97-107.
- Manaskova, P.; Meszarosova, A.; Liberda, J.; Voburka, Z.; Ticha, M. i Jonakova, V. 1999. *Aggregated forms of heparin-binding and non-heparin-binding proteins of boar seminal plasma and their binding properties*. *Folia Biol.*, 45(5):193-201.
- Manaskova, P.; Liberda, J.; Ticha, M. I Jonakova, V. 2000. *Aggregated and monomeric forms of proteins in boar seminal characterization and binding properties*. *Folia Biol.*, 46(4):143-151.
- Martín, S. 1982. *Reproducción e Inseminación Artificial Porcina*. Ed. Aedos. Barcelona.
- Martín, S. i de Alba, C. 1996. *Plasma seminal sintético: resultados de campo*. *Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc)*, 161:97-109.
- Martinet, L.; Mondain-Monval, M. 1993. *Seasonal reproduction and photoperiodism*. A: Thibault, C.; Lévasseur, M.C. i Hunter, R.H.F. *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. 605-626 pp.
- Martínez, P. 1985. *Apuntes Sobre Inseminación Artificial en Porcino*. Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca- Servicio de Extensión Agraria).
- Martínez, S.W.; Smith, K.E i Zering, K.D. 1998. *Analysis of changing methods of vertical coordination in the pork industry*. *J. Agr. Appl. Econ.*, 30(2):301-311.
- Marusi, A. i col. 1993. *Influence of an artificial photoperiod on sexual maturity and reproductive function of stallion*. *Ippologia*, 4(1):57-60
- Mattioli, M.; Bacci, M.L.; Galeati, G. I Seren, E. 1989. *Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro*. *Theriogenology*, 31:1201-1207.

- Mattson, D.L. i Bellehumeur, T.G. 1996. *Comparison of three chemiluminescent horseradish peroxidase substrates for immunoblotting*. Anal. Biochem., 240:306-308.
- Mauget, R. 1982. Seasonality of reproduction in the wild boar. A: Control of Pig Reproduction. Colo and Foxcroft Eds., Butterworths, London.
- Mauget, R. 1987. Reproductive Biology of the European Wild Boar. A: Definition of the Summer Infertility Problem in the Pig. Seren and Mattioli Eds. Commission of European Communities, Brussels, pp. 107-119.
- Mauget, R. i Boissin, J. 1987. *Seasonal changes in testis weight and testosterone concentration in the European Wild Boar (Sus scrofa L.)*. Anim. Reprod. Sci., 13:67-74.
- Mauget, R.; Ravault, J.P.; Chesneau, D.; Locatelli, A.; Saboureau, M.; Sempere, A.J. i Lacroix, A. 1990. *Peripheral plasma melatonin concentrations in the European wild boar: circadian and seasonal variations*. J. Reprod. Fert. Suppl., 40:371.
- Maywood, E.S. i Hastings, M.H. 1995. *Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin*. Endocrinol., 136(1):144-153.
- McConell, S.J. i Ellendorf, F. 1987. *Absence of nocturnal plasma melatonin surge under long and short artificial photoperiods in the domestic sow*. J. Pineal Res., 4:201-210.
- McDonald, L.E. 1991. Endocrinología Veterinaria y Reproducción 4a ed. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. México.
- McKenzie, F.F.; miller, J.C. i Bauguess, F.C. 1938. *The reproductive organs and semen of the boar*. Res Bull. Missouri. Agr. Exp. Sta., 279:122.
- Melrose, D.R. i O'Hagan, C. 1959. *Some observations on the collection of boar semen and its use for artificial insemination*. Ann. Zootech., (suppl.):69-79.
- Messenger, S.; Caillol, M. i Martinet, L. 1999. *Long-term exposure of hypothalamic explants to melatonin alters the release of gonadotrophin releasing hormone and the density of melatonin bindings sites in the pars tuberalis of the male mink (Mustela vison)*. J. Pineal, res., 26(1):17-27.
- Minton, J.E.; Fent, R.W. i Wettemann, R.P. 1985. *Influence of the duration of photoperiod on growth, testicular characteristics and endocrine function of boars*. Dom. Anim. Endocrinol., 2(1):53-59.

- Minton, J.E. i Wetemann, R.P. 1987. *Growth, testicular and endocrine function of boars exposed to 8, 16 or 24 hours of light daily before puberty*. Anim. Reprod. Sci., 14:239-244.
- Minton, J.E. i Wetemann, R.P. 1988. *The influence of duration of photoperiod and hemicastration on growth and testicular and endocrine functions of boars*. Dom. Anim. Endocrinol., 5(1):71-80.
- Minton, J.E.; Davis, D.L. i Stevenson, J.S. 1989. *Contribution of the photoperiod to circadian variations in serum cortisol and melatonin in boars*. Dom. Anim. Endocrinol., 6:177-181.
- Minton, J.E. i Cash, W.C. 1990. *Effect of cranial sympathectomy on circadian rhythms of cortisol, adenocorticotrophic hormone and melatonin in boars*. J. Anim. Sci., 68:4277-4284.
- Monfort, S.L.; Brown, J.L.; Bush, M.; Wood, T.C.; Wemmer, C.; Vargas, A.; Williamson, L.R.; Montali, R.J. i Wildt, D.E. 1993. *Circannual interrelationship among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (Cervus eldi thamin)*. J. Reprod. Fertil. 98(2):471-480.
- Mundy, A.J.; Ryder, T.A. i Edmonds, D.K. 1995. *Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece*. Hum. Reprod., 10:116-119.
- Nagai, T.; Niwa, K. i Iritani, A. 1984. *Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization in vitro of pig follicular oocytes*. J. Reprod. Fertil., 70:271-275.
- Nelson, R.J. 1990. *Photoperiodic responsiveness in house mice*. *physiol. Behav.*, 48(3):403-408.
- Nelson, R.J.; Moffat, C.A. i Goldman, B.D. 1994. *Reproductive and nonreproductive responsiveness to photoperiod in laboratory rats*. J. Pineal Res., 17(3):123-131.
- Nelson, R.J.; Moffat, C.A. i Goldman, B.D. 1994. *Reproductive and nonreproductive responsiveness to photoperiod in laboratory rats*. J. Pineal Res., 17(3):123-131.
- Nelson, R.J.; Gubernick, D.J. i Blom, J.M. 1995. *Influence of photoperiod, green food, and water availability on reproduction in male California mice (Peromyscus californicus)*. *Physiol. Behav.* 57(6):1175-1180.
- Nelson, R.J.; Fine, J.B.; Demas, G.E. i Moffatt, C.A. 1996. *Photoperiod and population density interact to affect reproductive and immune function in male prairie voles*. *Am. J. Physiol.*, 270(3 Pt 2):571-577.

- Nilowitz, P. i Hoffmann, K. 1988. *Pineal and pituitary involvement in the photoperiodic regulation of body weight, coat color and testicular size of the Djungarian hamster, Phodopus sungorus*. Biol. Reprod., 39(2):489-498.
- Niwa, T.; Ito, S.; Kudo, A.; Mizuho, A. i Soejima, A. 1959. *Techniques of artificial insemination with swine in Japan*. Ann. Zootech., 8 (suppl.): 97-103.
- Notter, D.R.; Chemineau, P. *Nocturnal melatonin and prolactin plasma concentration in sheep selected for fertility in autumn lambing*. J. Anim. Sci., 79(11):2895-2901.
- Ntunde, B.N.; Hacker, R.R. i King, G.J. 1979. *Influence of photoperiod on growth, puberty and plasma LH levels in gilts*. J. Anim. Sci., 48(6):1401-1406.
- O'Callaghan, D. i col. 1994. *Physiology of seasonality in sheep: role of photoperiod and melatonin*. 1st Europ. Conf. on Progress in Embryo Techn. and Genetic Eng. in Cattle and Sheep. Breeding.
- O'Brien, G.M.; Curlewis, J.D. i Martin, L. 1993. *Effect of photoperiod on the annual cycle of testis growth in atropical mammal. the little red flying fox, Pteropus scapulatus*. J. Reprod. Fertil., 98(1):121-127.
- Ombelet, W.; Menkveld, R.; Kruger, T.F. i Steeno, O. 1995. *Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility*. Hum. Reprod. Update, 1(6):543-557.
- Ortavant, R.; Mauleon, P. i Thibault, C. 1964. *Photoperiodic control of gonadal hypophyseal activity in domestic animals*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 177:157-193.
- Paradell, H. 1995. *Seasonal Infertility in Pigs*. Doctoral Thesis. Dept. of Agriculture, University of Aberdeen.
- Partonen, T. 1999. *Short note: melatonin-dependent infertility*. Med. Hypotheses, 52(5):487-488.
- Paterson, A.M.; Hughes, P.E. i Pearce, G.P. 1989. *The effect of season, frequency and duration of contact with boars on te attainment of puberty in gilts*. Anim. Reprod. Sci., 21:115-124.
- Paterson, A.M.; Pearce, G.P. i D'Antuono, M.F. 1991. *Seasonal variation in attainment of puberty in isolated and boar-exposed domestic gilts*. Anim. Reprod. Sci., 24:323-333.
- Paterson, A.M.; Martin, G.B.; Foldes, A.; Maxwell, C.A. i Pearce, G.P. 1992. *Concentrations of plasma melatonin and luteinizing hormone in domestic gilts reared under artificial long or short days*. J. Reprod. Fert., 94:85-95.

- Paterson, A.M.; Maxwell, C.A. i Foldes, A. 1992. *Seasonal inhibition of puberty in domestic gilts is overcome by melatonin administered orally, but not by implant*. J. Reprod. Fert., 94:97-105.
- Paterson, A.M. i Foldes, A. 1994. *Melatonin and farm animals: endogenous rhythms and exogenous applications*. J. Pineal Res., 16(4):167-177.
- Paquignon, M. 1984. Semen technology in the pig. A: COURT, M. (ed), *The Male in Farm Animal Reproduction*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp. 202-218.
- Peacock, J.A.; Evans, G. i Love, R.J. 1991. *The role of melatonin in seasonal infertility in pigs*. Adv. Pineal Res., 6:189-198.
- Peltoniemi, O.A.T.; Love, R.J.; Heinonen, M.; Tuovinen, V.; Saloniemi, H. 1999. *Seasonal and management effects on fertility of the sow: a descriptive study*. Anim. Reprod. Sci., 55:47-61.
- Peltoniemi, O.A.T.; Heinonen, M.; Leppävuori, A. i Love, R.J. 1999. *Seasonal effects on reproduction in the domestic sow in Finland- a herd record study*. Acta Vet. Scand., 40:133-144.
- Perez, B. i col. 1996. *Effect of photoperiod on semen production and quality in bucks of Verata and Malaguena breeds*. Small Ruminant Research, 22:2.
- Perez, M.C. 1991. *Producción espermática*. Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc), 104:4-11.
- Perez, R. i col. 1997. *Reproductive seasonality of corriedale rams under extensive rearing conditions*. Acta Vet. Scand., 38(1):109-117.
- Pérez-Llano, B.; Lorenzo, J.L.; Yenes, P.; Trejo, A. I García-Casado, P. 2001. *A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility*. Theriogenology, 56:387-398.
- Pérez-Pé, R.; Barrios, B.; Muiño-Blanco, T. i Cebrián-Pérez, J.A. 2001a. *Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system*. J. Chromat. B., 760:113-121.
- Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J.A. i Muiño-Blanco, T. 2001b. *Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa*. Theriogenology, 56:425-434.

- Pérez-Pé, R.; Grasa, P.; Fernández-Juan, M.; Peleato, M.L.; Cebrián-Pérez, J.A. i Muiño-Blanco, T. 2002. *Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa*. Mol. Reprod. Develop., 61:226-233.
- Perret, M. i Schilling, A. 1995. *Sexual responses to urinary chemosignals depend on photoperiod in a male primate*. Physiol. Behav., 58(4):633-639.
- Pevet, P. 1993. *Present and future of melatonin in human and animal reproduction functions*. Contracept. Fert. Sex, 21:727-732.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.D.; Bonet, S. i Badia, E. 1999a. *Efficiency of the process of meiosis in scrotal testes of healthy boars and unilateral abdominal cryptorchid boars*. Teratology, 60(4):209-214.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.D.; Bonet, S. i García, N. 1999b. *Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side*. Anim. Reprod. Sci., 55:269-278.
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M.D.; Bonet, S.; García, N. i Badia, E. 2000. *Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism*. J. Morphol., 244:190-202.
- Pinart, E.; Bonet, S.; Briz, M.D.; Pastor, L.M.; Sancho, S.; García, N.; Badia, E. i Bassols, J. 2001. *Lectin affinity of the seminiferous epithelium in healthy and cryptorchid post-pubertal boars*. Int. J. Androl., 24:153-164.
- Polge, C. 1956. *Artificial insemination in pigs*. Veterinary Record, 68:62-76.
- Poly, W.J. 1997. *Nongeneric variation, genetic-environmental interactions and altered gene expression. 1. Temperature, photoperiod, diet, pH and sex-related effects*. Comparative Biochemistry and Physiol., 117(1):11-66.
- Pomerol, J.M. i Arrondo, J.A. 1994. *Pràctica Andrològica*. Ed. Masson-Salvat. Barcelona.
- Pond, W.G.; Yes, J.T., Maurer, R.R. i Christenson, R.K. 1981. *Effect of doubling daily energy intake during the last two weeks of pregnancy on pig birth weight survival and weaning weight*. J. Anim. Sci., 52(3):535-541.
- Potter, R. 1995. *Investigation into boar infertility (1). Clinical examination*. Pig Journal, 35:28-233.
- Prunier, A.; Dourmand, J. i Etienne, M. 1994. *Effect of light regimen under various ambient temperatures on sow and litter performance*. J. Anim. Sci., 72:1461-1466.

- Pudney, J. i Fawcett, D.W. 1984. *Seasonal changes in fine structure of the ductulis efferents of the ground squirrel, Citellus lateralis (say)*. Anat. Rec., 208:383-399.
- Radford, P. 1961. *Factors influencing the proprieties of boar semen*. Vet. Rec., 73:798-800.
- Raitiere, M.N.; Garyfallou, V.T. i Urbanski, H.F. 1995. *Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis, but not in the lateral septum, inhibit short-photoperiod-induced testicular regression in Syrian hamsters*. Brain Res., 705(1-2):159-167.
- Rasbech, N.O. 1984. *The Male and Fertility of Domestic Animals*. A: Court, M. (ed), *The Male in Farm Animal Reproduction*. Martinus Nijhoff-Publishers, Dordrech, pp 2-23.
- Rathje, T.A.; Johnson, R.K. i Lunstra, D.D. 1995. *Sperm production in boars after nine generations of selection for increased weight of testis*. J. Anim. Sci., 73(8):2177-2185.
- Recio, J.; Pevet, P.; Miguez, J.M. i Masson-Pevet, M. 1996. *Melatonin receptors in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of testosterone induced photoresponsive rats*. Neurosci. Lett., 214:53-56.
- Ribelayga, C.; Pevet, P. i Simonneaux, V. 2000. *HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian Hamster*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 278(5):R1339-1345.
- Rigau, T.; Farré, M.; Ballester, J.; Mogas, T.; Peña, A. I Rodríguez-Gil, J.E. 2001. *Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates*. Theriogenology, 56:801-815.
- Rigau, T.; Rivera, M.; Palomo, M.J.; Fernández-Novell, J.M.; Mogas, T.; Ballester, J.; Peña, A.; Otaegui, P.J.; Guinovart, J.J. i Rodríguez-Gil. 2002. *Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa*. Reproduction, 123:579-591.
- Rigo, A. i Genescà, G. 2000. *Tesis i Treballs. Aspectes formals*. Eumo Editorial. Vic.
- Robaire, B. 1999. *Fifty years of insight into the seminiferous epithelium: a tribute to Yves W. Clerment*. A: Gagnen, C. (ed). *The Male Gamete: from Basic Science to Clinical Applications*. Cache River Press. 1-4 pp.
- Rocha, D.C.M.; Debeljuk, L. I França, L.R. 1999. *Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats*. Tissue and Cell, 31(3):372-379.

- Roelants, H.; Schneider, F.; Goritz, F.; Streich, J. i Blottner, S. 2002. *Seasonal changes of spermatogonial proliferation in Roe Deer demonstrated by flow cytometric analysis of c-kit receptor, in relation to follicle-stimulating hormone, and testosterone*. Biol. of Reprod., 66(2):305-312.
- Roldan, E.R.S. 1998. *Signal transduction during mammalian sperm acrosomal exocytosis*. A: Lauria, A.; Ganfoldi, F.; Enne, G.; Gianaroli, L. (ed.): Gametes: Development and Function. Serono Symposium, Roma, pp 219-228.
- Rolf, HJ. i col. 1996. *Serum testosterone, 5-alpha-dihidrotestosterone and different sex characteristics in male fallow deer (Cervus dama): A long-term experiment with accelerated photoperiods*. Comparative Biochem. and Physiol. A. Physiol., 115(3):207-221.
- Roser, J.F. i Hughes, J.P. 1992. *Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations, and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions*. J. Androl., 13(3):214-223.
- Roth, E. i Smidt, D. 1970. *On early semen collection by electro-ejaculation of German improved Landrace and Göttingern-ejaculation pigs*. Berl. Münch. Tier. Wschr., 83:7-11 (A.B.A.,1970:2815).
- Rothschild, Lord. 1953. *A new method for measuring the activity of spermatozoa*. J. Exp. Biol., 30:178.
- Rothschild, M.P. 1990. *The role of biology in future pig breeding programs*. Proceedings of the 4th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (Edinburgh), 15:415-424.
- Saiz, F.; de Alba, C.; Marigorta, P.; Sagües, A. i Martín, S. 1993. *Investigación de parámetros bioquímicos en plasma seminal de verraco*. Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc), 128: 27-36.
- Sánchez, M.; Cereza, J.M. i García, M. 1989. *Influencia de las condiciones ambientales en la fertilidad del verraco*. Proceedings x Symposium, Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc): 67-73.
- Sánchez, R. 1991. *Control de calidad espermática*. Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient. (Anaporc), 104:27-33.
- Sancho, S.; García-Gil, N.; Badia, E.; Pinart, E.; Briz, M.D.; Rodríguez-Gil, J.E.; Rigau, T.; Palomo, M.J.; Bassols, J. i Bonet, S. 1999. *Efectes de l'obscuritat sobre la qualitat del semen de mascles reproductors porcíns*. Scientia gerundensis, 24:115-125.

- Sanz, L.; Calvete, J.J.; Mann, K.; Gabius, H.J. i Topfer-Petersen, E. 1993. *Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization*. Mol. Reprod. Dev., 35(1):37-43.
- Sarlos, P. i Molnar, A. 1995. *Seasonal changes in sperm parameters of British milk rams*. Acta Vet. Hung., 43(2-3):247-257.
- Schanbacher, B.D. i Crouse, J.D. 1980. *Growth and performance of growing-finishing lambs exposed to long or short photoperiods*. J. Anim. Sci., 51(4):943-948.
- Schilling, E.; Vengust, M.; Bast, G. i Tomac, M. 1986. *The Osmotic Resistance test (ORT) of Boar Spermatozoa and the Relation to Pregnancy Rate and Litter Size*. 9th Congress IPVS. Barcelona, pp. 77.
- Schilling, E. i Vengust, M. 1987. *Frequency of semen collection in boars and quality of ejaculates as evaluated by the osmotic resistance of acrosomal membranes*. Anim. Reprod. Sci., 12:283-290.
- Schinckel, A.P. i col. 1884. *Relationship among measures of testicular development and endocrine functions in boars*. J. Anim. Sci., 58 (5):1255-1261.
- Schlatt, S.; De Geyter, M.; Kliesch, S.; Nieschlag, E. i Bergmann, M. 1995. *Spontaneous recrudescence of spermatogenesis in the photoinhibited male Djungarian hamster, Phodopus sungorus*. Biol. Reprod., 53(5):169-177.
- Schneider, F.; Falkenberg, H.; Kuhn, G.; Nürnberg, K.; Rehfeldt, Ch. I Kanitz, W. 1997. *Effect of treating young boars with a GnRH depot formulation on endocrine functions, testis, size, boar taint, carcass composition and muscular structure*. Anim. Reprod. Sci., 50:69-80.
- Schopper, D.; Gaus, J.; Claus, R. i Bader, H.. 1984. *Seasonal changes of steroid concentrations in seminal plasma of a European wild-boar*. Acta Endocrinol. (Copenh), 107(3):425-427.
- Setchell, B.P. 1991. *Male reproductive organs and semen*. A Cupps, P.T. (ed), *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, Inc., San Diego, California. Cap. 6, pp. 221-249.
- Setchell, B.P.; Maddocks, S. I Brooks, D.E. 1994. *Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tracts*. A: Knobil, E. i Neill, J.D. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. 1063-1076 pp.
- Shaffer, H.E. i Almquist, J.O. 1948. *Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture*. J. Dairy Sci., 31:677.

- Sharp, P.J. 1993. *Photoperiodic control of reproduction in the domestic hen*. Poultry Sci., 72:897-905.
- Shaw, D. i Goldman, B.D. 1995. *Influence of prenatal and postnatal photoperiods on postnatal testis development in the Siberian hamster (Phodopus sungorus)*. Biol. Reprod., 52(4):833-838.
- Silman, R.E. 1993. *Melatonin: a contraceptive for the nineties*. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 49:3-9.
- Sloyan, M.J. 1998. The Impact of the GATT Pig Meat World Trade Agreement on the U.K. and E.U. Pig Industry. A: Wiseman, J.; Varley, M.A.; Chadwick, J.P. Progress in Pig Science. Nottingham University Press. Nottingham.
- Smidt, D. 1965. Die Schweine Besamung Verlas M.H. Schaper, Hannover.
- Smith, C.A. i Almond, G.W. 1991. *Effects of season and stage of gestation of luteinizing hormone release in gilts*. Can. J. Vet. Res., 55:294-297.
- Smits, L.J.; Zielhuis, G.A.; Jongbloet, P.H. i Straatman, H. 1998. *Seasonal variation in human fecundability*. Hum. Reprod, 13(12):3520-3524.
- Sokoloski, J.E.; Blasco, L.; Storey, B.T. i Wolf, D.P. 1977. *Turbidimetric analysis of human sperm motility*. Fertil. Steril., 28:1337-1341.
- Stefulj, J.; Hörtnner, M.; Ghosh, M.; Schauenstein, K.; Rinner, I.; Wölfler, A.; Semmler, J. i Liebmann, M. 2001. *Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat*. J. Pineal. Res., 30:243-247.
- Stork, M.G. 1979. *Seasonal reproductive inefficiency in large pig breeding units in Britain*. Vet. Rec., 104:49-52.
- Strzezek, J.; Martín, S. i Saiz, F. 1999. *Fisiología reproductiva del verraco*. Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc), 191:54-75.
- Strzezek, J.; Martín, S. i Saiz, F. 1999. *Glándula vesicular seminal de verraco: su papel en la capacidad de fertilización*. Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc), 205:59-84.
- Sullivan, R. 1999. Interaction between sperm and epididymal secretory proteins. A: Gagnen, C. (ed). The Male Gamete: from Basic Science to Clinical Applications. Cache River Press.93-104 pp.
- Swiestra, E.E. 1970. In Effect of Disease and Stress on Reproductive Efficiency in Swine. Ed. By M. Lucas and J.F. Waper., p. 8. University of Nebraska. Coop. Ext. Service.

- Tast, A.; Halli, O.; Ahlstrom, S.; Andersson, H.; Love, R.J. i Peltoniemi, O.A. 2001. *Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the European wild boar and domestic gilt*. J. Pineal Res., 30:43-49.
- Taymor, M.L. 1990. Semen analysis. A: infertility. Plenum Publishing Corporation. New York. Capt. 12, pp. 89-98.
- Tejada, R.I.; Mitchell, J.C.; Norman, A.; Marik, J.J. i Friedman, S. 1984. *A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence*. Fertil. Steril., 42:87-91.
- Thibault, Ch.; Levasseur, M.C. i Hunter, R.H.F. 1993. Reproduction in Mammals and Man. Ellipses. Paris.
- Tigchelaar, P.V. i Nalbandov, A.V. 1971. *Comparison of various commercial preparations of melatonin in immature rats*. J. Reprod. Fertil., 25(1):141-143.
- Trudeau, V.L. i Sanford, L.M. 1986. *Season and social environment influence the membrane integrity of ejaculated boar spermatozoa as assessed by ouabain sensitivity*. Can. J. Physiol. Pharmacol., 64(11):1407-1412.
- Trudeau, V.L. i Sandford, L.M. 1990. *Influence of season and social environment on the reproductive-endocrine status of the adult Landrace Boar*. Can. J. Anim. Sci., 70:121-128.
- Trudeau, V.L. i Sanford, L.M. 1986. *Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult Landrace Boar*. J. Anim. Sci., 63:1211-1219.
- Tso, W.W. i Lee, W.M. 1980. Seminal plasma and progressive motility of boar spermatozoa. Int. J. Androl., 3(3):243-250.
- Varley, M. 1991. *Stress and reproduction*. Pig New Info., 12:567-571.
- Vaughan, M.K. i col. 1994. Circadian rhythms in reproductive and thyroid hormones in gonadally regressed male hamsters exposed to natural autumn photoperiod and temperature conditions. Neuroendocrinol., 60(1):96-104.
- Veznik, Z. i col. 1992. *Ejaculate quality as an indicator of the effect of environment (cattle)*. Roda 9 (Special Issue): 299-300.
- Vigil, M.E.; Abascal, G.C.; Cantero, C.C. i Lasola, R.P.J. 1986. *Variables ambientales que determinan la calidad seminal en el verraco*. Revista de la Asociación Nacional de Porcinocultura (Anaporc), 49:71-83.

- Vitale, M.L.; Cardin, J.; Gilula, N.B.; Carbajal, M.E. i Pelletier, R.M. 2001. *Dynamics of connexin 43 levels and distribution in the mink (Mustela vison) anterior pituitary are associated with seasonal changes in anterior pituitary prolactin content.* Biol. Reprod., 64:625-633.
- Wan, S.S.; Hennessy, DP. i col. 1994. *Seasonal infertility, stress and adrenocortical responsiveness in pigs.* Anim. Reprod. Sci., 34(3-4):265-278.
- Warnick, A.C.; Wiggins, E.L.; Casida, L.E.; Grummer, R.H. i Chapman, A.B. 1951. *Variations in puberty phenomena in bred gilts.* J. Anim. Sci., 10:479-493.
- Watson, P.F. A: Morris, G.J.; i Clarke, A. 1981. (ed.). *Effect of Low Temperatures on Biological Membranes.* Academic Press. London
- Weiler, U.; Claus, R. Dehnhard, M.; Hofäcker, S. 1996. *Influence of the photoperiod and a light reverse program on metabolically active hormones and food intake in domestic pigs compared with a wild boar.* Canadian J. Anim. Sci., 76(4):531-539.
- Weitze, K.F. i Petzoldt, R. 1992. *Preservation of semen.* Anim. Reprod. Sci., 28:229-235.
- WHO, World Health Organization. 1999. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction.* (4^a ed). Cambridge University Press.
- Williams, A.C. i Ford, W.C.L. 2001. *The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa.* J. Androl., 22:680-692.
- Wiseman, J.; Varley, M.A. i Chadwick, J.P. 1998. *Progress in Pig Science.* Nottingham University Press. Nottingham.
- Wettemann, R.P. i Bazer, F.W. 1985. *Influence of environmental temperature on prolificacy of pigs.* J. Reprod. Fertil. Suppl., 33:199-208.
- Wurtman, R.J.; Axelrod, J.; Sedvall, G. i Moore, R.Y. 1967. *Photic and neural control of the 24-hour norepinephrine rhythm in the rat pineal gland.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 157(3):487-492.
- Wolfe, R.L.; Wolfe, N.W.; Strumpf, T.T.; Kittok, R.J.; Johnson, R.K. i Kinder, J.E. 1989. *Response to luteinizing hormone releasing hormone in postpubertal boars with large testes.* Domest. Anim. Endocrinol., 6(3):211-218.

- Xue, J.L.; Dial, G.D.; Bartsh, S.; Kerkaert, B.; Squires, E.J.; Marsh, W.E. i Feise, J. 1994a. *Influence of a gonadotropin-releasing hormone agonist on circulating concentrations of luteinizing hormone and testosterone and tissue concentrations of compounds associated with boar taint*. J. Anim. Sci., 72:1290-1298.
- Xue, J.L.; Dial, G.D.; Marsh, W.E. i Davis, P.R. 1994b. *Multiple manifestations of season on reproductive performance of commercial swine*. J. American Vet. Med. Ass., 204(9):1486-1489.
- Yellon, S.M. i col. 1994. *Effects of photoperiod on reproduction and the Gn-RH-immunoreactive neuron system in the postpubertal male Djungarian hamster*. Biol. Reprod., 50(2):368-372.
- Yellon, S.M. 1996. *60-Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm and photoperiod control of reproduction*. Am. J. Physiol., 270(5 Pt 1):816-821.
- Yellon, S.M. i Tran, L.T. 2002. *Photoperiod, reproduction, and immunity in select strains of inbred mice*. J. Biol. Rhythms, 17(1):65-75.
- Yeung, C.H.; Cooper, T.G.; Oberpenning, F.; Shulze, H. i Nieschlag, E. 1993. *Changes in movement characteristics of human spermatozoa along the length of the epididymis*. Biol. Reprod., 49:274-280.
- Young, K.A. i Nelson, R.J. 2001. *Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis*. Reproduction, 122(5):677-85.
- Zamboni, L. 1992. *Sperm structure and its relevance to infertility*. Arch. Pathol. Lab. Med., 116:325-344.