

Evaluación de calidad del semen y comportamiento sexual de verracos en climas tropicales

por

Cristina N. Vilaró Vélez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

CIENCIA ANIMAL

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2018

Aprobado por:

Enid Arcelay Ruiz, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Héctor Sánchez Rodríguez, Ph.D.
Miembro del Comité Graduado

Fecha

Carmen S. Santana Nieves, Ph.D.
Presidente del Comité Graduado

Fecha

José R. Latorre Acevedo, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

Jay O. Soto Vélez, M.S., M.I.S, C.L.A.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Abstract

Semen quality and sexual behavior of Yorkshire boars raised in a tropical environment were evaluated during a whole year, using a 2x2x2 factorial arrangement with age (2 and 5 years), time of the day (AM and PM) and season (Cool: November to April and Hot: May to October) as the main factors with their respective interactions. The interactions age of the boar x time of the day and age of the boar x season of the year, and time of the day x season of the year affected ($P < 0.10$) sperm concentration/mL and total sperm. Both variables were greater for the semen collected from the younger boar during the afternoon ($>373.6 \pm 23.3 \times 10^6$ spermatozoa/mL and $>85770 \pm 4246.14 \times 10^6$ total sperm) and in the cool season ($>406.4 \pm 22.4 \times 10^6$ spermatozoa/mL and $>94572 \pm 2581.0 \times 10^6$ total sperm). Sperm concentration/mL was greater when the boars were collected in the afternoon during the cool season ($436.83 \pm 60.56 \times 10^6$ spermatozoa/mL) for dilution factor 2 (FD2), whereas total sperm varied among the different methods of semen evaluation. Percentage of spermatozoa normality was affected by the interaction age of the boar x time of day for semen diluted using dilution factor 1 (FD1), being superior for the older boar during the afternoon ($76.25 \pm 3.10\%$, $P = 0.08$). Likewise, the older boar shown the greater % of normality for the undiluted semen when evaluated in CASA ($58.36 \pm 2.10\%$, $P = 0.006$). Age of the boar and season of the year affected ($P < 0.10$) the % of spermatozoa progressive movement, being superior for the older boar and during the cool season. The total volume of the gel-free semen fraction, was affected by the interaction age of the boar x season of the year, being greater for the older boar when collected during the cool season (416.0 ± 15.3 mL, $P = 0.02$). Similarly, the variables of sexual behavior (pre-mount and ejaculation) were affected ($P < 0.10$) by the interaction age of the boar x season of the year. Pre-mount was longer for the younger boar during the hot season, while ejaculation was shorter for the younger boar during cool season. Meanwhile the duration of the mount was longer for younger boar ($P = 0.001$) and when collected during cool season ($P = 0.04$). Rectal temperature evaluated during the semen collection as an indicator of thermal stress, was greater for the younger boar ($36.75 \pm 0.10^\circ\text{C}$, $P = 0.03$) during the whole experimental period. It was also greater when the boars were collected in the afternoon ($37.04 \pm 0.10^\circ\text{C}$, $P = 0.07$) and during the hot season ($36.72 \pm 0.09^\circ\text{C}$, $P \leq 0.001$). The results of the present research suggest that semen quality and sexual behavior of boars in a tropical environment is age, collecting time of the day and season dependent.

Resumen

La calidad del semen y el comportamiento sexual de verracos Yorkshire criados en un ambiente tropical fueron evaluados durante todo un año, utilizando un arreglo factorial 2x2x2 con edad (2 y 5 años), hora del día (AM y PM) y época (Fresca: noviembre a abril y Caliente: mayo a octubre) como los efectos principales con sus respectivas interacciones. Las interacciones edad del verraco x tiempo del día y edad del verraco x época del año, y tiempo del día x época del año afectaron ($P < 0.10$) la concentración de espermatozoides/mL y total de espermatozoides. Ambas variables fueron mayores para el semen colectado del verraco joven durante la tarde ($>373.6 \pm 23.3 \times 10^6$ espermatozoides/mL y $>85770 \pm 4246.14 \times 10^6$ total de espermatozoides) y en la época fresca ($>406.4 \pm 22.4 \times 10^6$ espermatozoides/mL y $>94572 \pm 2581.0 \times 10^6$ total de espermatozoides). La concentración de espermatozoides/mL fue mayor cuando los verracos fueron recolectados por la tarde durante la época fresca ($436.83 \pm 60.56 \times 10^6$ espermatozoides/mL) para factor de dilución 2 (FD2), mientras que el total de espermatozoides varió entre los diferentes métodos de evaluación del semen. El porcentaje de espermatozoides normales fue afectado por la interacción edad del verraco x tiempo del día para el semen diluido usando factor de dilución 1 (FD1), siendo superior para el verraco mayor durante la tarde ($76.25 \pm 3.10\%$, $P = 0.08$). Asimismo, el verraco mayor mostró superior % de normalidad para el semen sin diluir cuando se evaluó en CASA ($58.36 \pm 2.10\%$, $P = 0.006$). La edad del verraco y la época del año afectaron ($P < 0.10$) el % de movimiento progresivo de los espermatozoides, siendo superior para el verraco mayor y durante la época fresca. El volumen total de semen filtrado fue afectado por la interacción edad del verraco x época del año, siendo superior para el verraco mayor cuando se colectó durante la época fresca ($416.0 \pm 15.3\text{mL}$, $P = 0.02$). Igualmente, las variables de comportamiento sexual (pre-monta, y eyaculación) fueron afectadas ($P < 0.10$) por la interacción edad del verraco x época del año. La pre-monta fue más larga para el verraco joven durante la época caliente, mientras que la eyaculación fue más corta para el verraco joven durante la época fresca. Mientras tanto, la duración de monta fue más larga para el verraco joven ($P = 0.001$) y cuando eran colectados en la época fresca ($P = 0.004$). La temperatura rectal evaluada durante la colección de semen como un indicador de estrés térmico, fue mayor para el verraco joven ($36.75 \pm 0.10^\circ\text{C}$, $P = 0.03$). También fue mayor cuando los verracos fueron colectados en la tarde ($37.04 \pm 0.10^\circ\text{C}$, $P = 0.07$) y durante la época caliente ($36.72 \pm 0.09^\circ\text{C}$, $P \leq 0.001$). Los resultados de la presente investigación sugieren que la

calidad del semen y el comportamiento sexual de verracos en un ambiente tropical es dependiente de la edad, del tiempo del día en que son colectados y la época.

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a mis padres, Luis J. Vilaró Suarez y Nydia Vélez Varela, los cuales adoro con mi vida. Por su trabajo, sacrificio y dedicación para proveer a mí y a mis hermanos lo mejor, en especial nuestra educación. Por ser un ejemplo a seguir tanto en la vida personal como profesional. Porque a pesar de nuestras diferencias de opiniones me apoyaron incondicionalmente, me guiaron con sus consejos, me motivaron durante este arduo proceso y siempre creyeron en mí.

Agradecimiento

Agradezco al Departamento de Ciencia Animal y a la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, localizada en Lajas, por permitirme realizar la investigación en sus facilidades y utilizar sus verracos. A el Dr. Héctor Sánchez y la Dra. Enid Arcelay por ser parte de mi comité graduado. Al Dr. Raúl Macchiavelli por tomar de su tiempo para contestar todas mis dudas de análisis estadístico. A Norberto Vega, empleado de la Estación Experimental Agrícola, y los estudiantes Mónica Colón, Alberto Rodríguez y César Rodríguez por ayudarme en la colección de semen y manejo de los verracos. A mi familia y amistades por siempre apoyarme y motivarme para lograr culminar la tesis, en especial a mis padres cuyo apoyo económico y emocional fueron esencial. Por último, y para mí la persona más importante durante este proceso, a la Dra. Carmen Santana, quien me guió durante toda la investigación y nunca me dejó sola. Gracias por toda su paciencia, tiempo, esfuerzo y apoyo. Sin duda, esta tesis no la pudiese haber logrado sin usted.

Tabla de Contenido

Contenido	Páginas
Lista de Tablas	x
Listas de Figuras	xi
Listas de Apéndices	xii
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	3
A. Importancia de la inseminación artificial	3
B. Metodología de la inseminación artificial	4
1. Colección de semen	4
2. Evaluación del semen	4
a. Características	4
b. Instrumentación para evaluar semen	5
3. Factores que afectan la calidad del semen	7
a. Genética	7
b. Edad	8
c. Estado nutricional	8
d. Tamaño testicular	10
e. Frecuencia de colección	11
f. Factores ambientales	11
4. Comportamiento sexual del verraco	13
III. Objetivos	15
IV. Materiales y métodos	16
A. Facilidades y animales	16
B. Época del año y temperatura ambiental	16
C. Colección de semen	17
D. Volumen y concentración	18

E. Análisis de CASA	18
F. Análisis estadísticos	20
1. Calidad del semen	20
2. Comportamiento sexual	22
3. Temperatura rectal	22
4. Regresiones	23
V. Resultados y discusión	25
A. Calidad del semen	25
1. Concentración del semen	25
2. Total de espermatozoides en semen filtrado	29
3. Porcentaje de normalidad y movimiento progresivo de espermatozoides evaluados en CASA	32
4. Volumen total de semen filtrado	33
5. Spermacue® vs CASA	34
B. Comportamiento sexual	35
C. Temperatura rectal	37
D. Regresiones	39
1. Calidad del semen	39
a. Concentración del semen	39
b. Total de espermatozoides en semen filtrado	42
c. Porcentaje de movimiento progresivo de espermatozoides evaluados por CASA	45
d. Volumen total de semen filtrado	46

e. Efecto de la temperatura rectal sobre concentración del semen, el total de espermatozoides y porcentaje de movimiento progresivo	46
2. Comportamiento sexual	48
a. Duración de monta.....	48
b. Duración de eyaculación.....	49
VI. Conclusión	50
VII. Recomendaciones	51
VIII. Referencias bibliográficas.....	52
IX. Apéndices.....	57

Lista de Tablas

Tablas	Páginas
Tabla 1. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x tiempo del día en que se colectó sobre la concentración del semen (número de espermatozoides x 10 ⁶ /mL) en diferentes diluciones	26
Tabla 2. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre la concentración del semen (número de espermatozoides x 10 ⁶ /mL) en diferentes diluciones	28
Tabla 3. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x tiempo del día en que se colectó sobre el total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10 ⁶) en diferentes diluciones (FD1 y FD2).....	30
Tabla 4. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre el total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10 ⁶) en diferentes diluciones.....	31
Tabla 5. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción época del año x tiempo del día en que se colectó sobre el total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10 ⁶) en diferentes diluciones.....	31
Tabla 6. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para porcentaje de movimiento progresivo (%) de espermatozoides en semen evaluado por CASA para edad del verraco	33
Tabla 7. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre el volumen total (mL) de semen filtrado.....	34
Tabla 8. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para datos transformados y Media para datos originales (segundos) para la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre la actividad de monta de los verracos	37
Tabla 9. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para temperatura rectal (°C) de verracos	38

Lista de Figuras

Figuras	Páginas
Figura 1. Relación entre la temperatura rectal y la concentración del semen según evaluado por SpermaCue® para el verraco joven	40
Figura 2. Relación entre la temperatura rectal y la concentración del semen según evaluado por SpermaCue® para el verraco mayor.....	40
Figura 3. Relación entre la temperatura rectal y la concentración del semen sin diluir según evaluado por CASA para el verraco mayor	42
Figura 4. Relación entre la temperatura rectal y la concentración del semen diluido en FD1 evaluado por CASA para el verraco joven	42
Figura 5. Relación entre la temperatura rectal y el total de espermatozoides en semen sin diluir evaluada por CASA para el verraco mayor	44
Figura 6. Relación entre la temperatura rectal y el total de espermatozoides en semen diluido en FD1 evaluada por CASA para el verraco joven	45
Figura 7. Relación entre la temperatura rectal y porcentaje de movimiento progresivo en semen sin diluir evaluado por CASA para el verraco mayor.....	46

Lista de Apéndices

Apéndice	Páginas
Apéndice 1. Datos de promedio de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, durante el periodo de 1/1/1948 a 4/30/2012 para Lajas, PR, según reportados por “Southeast Regional Climate Center” (SERCC, 2007)	57
Apéndice 2. Gráfica de promedio de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, durante el periodo de 1/1/1948 y 4/30/2012 para Lajas, PR, según reportados por “Southeast Regional Climate Center” (SERCC, 2007)	58
Apéndice 3. Datos de promedio de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, según recolectados en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.	59
Apéndice 4. Gráfica de promedio de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, según recolectados en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.	60
Apéndice 5. Datos de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, dentro del corral de colección, en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.	61
Apéndice 6. Gráfica de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, dentro del corral de colección, en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.	62
Apéndice 7. Datos de humedad relativa (%) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, dentro del corral de colección, en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.	63
Apéndice 8. Gráfica de humedad relativa (%) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, dentro del corral de colección, en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.	64
Apéndice 9. Datos transformados para duración de pre-monta, monta y eyaculación	65

I. Introducción

Para el año 2050, se estima que la población mundial aumentará a 9.3 billones de personas (Nardone et al., 2010). Debido a los cambios climatológicos como el calentamiento global, la seguridad de agua y comida será una de las prioridades para el ser humano (Nardone et al., 2010). Se espera que el aumento en el consumo de carne sea el doble al actual (Nardone et al., 2010) y que el consumo de carne de cerdo aumente un 40% (Philippe y Nicks, 2015). Por tal razón, la producción de alimentos derivados de animales debe ser incrementada de una manera eficiente para poder satisfacer estas necesidades.

Actualmente, la inseminación artificial (IA) es usada en más del 95% de las cerdas en países productores de carne de cerdo (Schulze et al., 2014). Esto representa un punto crítico en la industria porcina, siendo el verraco el que más se destaca, al ser utilizado para aparear gran cantidad de hembras. De hecho, solamente en Estados Unidos de América hay más de 20,000 verracos en aproximadamente 120 granjas dedicadas a la colección y venta de semen (Schulze et al., 2014).

El éxito de la IA depende de la identificación y selección apropiada de verracos basado en su rendimiento reproductivo, evaluando características como lo son libido, habilidad para apareamiento y, sobre todo, calidad de semen (Žaja et al., 2016). Es por esto que el mayor énfasis por parte de los criadores comerciales que usan inseminación artificial va dirigido a los resultados de fertilidad. La calidad y cantidad de semen son considerados como los factores principales que afectan el número de dosis para inseminación artificial que se pueden obtener de un eyaculado (Flowers, 2008). Según Schulze et al. (2014), la calidad del semen sirve como un criterio básico para asegurar una producción con un alto número de crías y por ende una mayor cantidad de carne disponible para consumo humano.

La calidad del semen de verraco y los factores que la afectan son de suma importancia para los criadores de cerdos. González-Peña et al. (2016) recomendaron los siguientes criterios para evaluar la calidad del semen eyaculado: volumen, concentración, porcentaje de espermatozoides móviles y morfología. Un factor ambiental importante que afecta adversamente la calidad y cantidad de semen producido lo es el aumento en la temperatura ambiental (Nardone et al., 2010).

Ha sido claramente demostrado que temperaturas ambientales mayores de 30°C reducen la concentración y motilidad y afectan el volumen y la morfología del semen de verraco (Sonderman y Luebbe, 2008; Kunavongkrit et al., 2005; Suriyasomboon et al., 2004). Los efectos adversos del estrés por calor sobre la eficiencia reproductiva del verraco no solo se limitan a la calidad del semen. El comportamiento sexual también puede verse afectado, manifestándose por una disminución en la duración de los comportamientos de pre-cópula y cópula (Prince, 1985). Todo esto tiene como resultando una reducción en la eficiencia reproductiva de los cerdos, causando una disminución en la producción de carne, y por ende, pérdidas económicas en la finca. En Estados Unidos de América, las pérdidas por estrés de calor para la industria porcina han sido estimadas en millones de dólares al año (St-Pierre et al., 2003, citado por Qu, 2016).

Para optimizar el manejo reproductivo de los verracos, y por ende la eficiencia reproductiva dentro de la finca, se debe enfatizar sobre los efectos que el ambiente climático tiene sobre la producción de semen y el comportamiento sexual de los verracos. A pesar de que más del 50% de la producción porcina mundial ocurre en regiones tropicales y sub-tropicales (Rosé et al., 2017) donde la mayor parte del año la temperatura del aire excede 30°C y la humedad sobrepasa el 85%, poco se conoce sobre los efectos del clima tropical en verracos criados bajo estas condiciones ambientales. Por esta razón, en la presente investigación se evaluó el efecto que tiene la edad, tiempo del día en que se colectaba y época del año, sobre la calidad del semen y el comportamiento sexual de verracos criados en un ambiente tropical.

II. Revisión de literatura

A. Importancia de la inseminación artificial

La IA es el proceso por el cual se deposita semen en el tracto reproductivo de la hembra durante su periodo fértil por medios mecánicos, para obtener una preñez (Shinde y Gupta, 2016). El uso de la IA para la crianza comercial de cerdos ha sido instrumental para facilitar mejoras globales en la fertilidad, genética, mano de obra y salud del hato (Knox, 2016). El aumento en el uso de esta técnica ha incrementado drásticamente la cantidad de verracos necesarios para la colección diaria de semen en centros de colección y venta de semen (Levis y Reicks, 2005). Debemos resaltar que hoy en día, la eficiencia y ganancia económica en la producción porcina comercial están atadas al uso de IA y la capacidad de poder producir un semen de alta calidad en grandes cantidades. Schulze et al. (2014) y Pruneda et al. (2005) destacaron que la meta económica primordial en los centros de inseminación artificial es producir una gran cantidad de semen de alta calidad en un periodo corto de tiempo.

Actualmente más del 95% de las cerdas en países productores de carne de cerdo son sometidas a IA. Esto representa un elemento crucial en la industria de crianza de cerdos (Schulze et al., 2014). Esta herramienta reproductiva presenta ventajas y desventajas que los criadores de cerdos deben poder reconocer al utilizar la misma técnica. Algunas de las ventajas, según descritas por Shinde y Gupta (2016), incluyen: (1) maximizar el uso de los verracos, (2) mejoramiento genético utilizando semen de animales superiores con características deseadas para el hato, (3) uso de verracos pesados en hembras livianas, (4) mayor control sanitario e higiene y (5) mejor control en programas de cruzamiento. Entre algunas de las desventajas se encuentran: (1) requerimiento de personal adiestrado para la colección de semen e inseminación artificial, (2) detección de celo y (3) práctica de inseminación artificial adecuada (Shinde y Gupta, 2016). Knox (2016) añade que con el uso de IA se reducen los incidentes de transmisión de enfermedades venéreas en fincas de cría y la cantidad de incidentes de hembras lastimadas por verracos durante monta natural. En adición, la cantidad necesaria de verracos disminuye ya que se pueden preñar más cerdas en comparación con monta natural. Por último, el agricultor tendría un mejor conocimiento de los cruzamientos considerando que ellos son los que están inseminando y no dejando que sus animales se apareen solos.

B. Metodología de la inseminación artificial

1. Colección de semen

Antes de usar la IA, el verraco a utilizarse debe estar entrenado para ser colectado. Para esto se adiestran los verracos a ir a la jaula de colección, montarse en el “dummy” y eyacular. Shinde y Gupta (2016) recomendaron que los verracos deben ser entrenados entre los 8 y 10 meses de edad, simultáneamente con la llegada de la madurez sexual. Una vez entrenados, se puede llevar a cabo una colección efectiva. La misma se puede realizar en fincas especializadas que producen y venden semen a criadores de cerdos o en la misma finca del porcinocultor. La mayoría de las colecciones de semen ocurren usando la técnica de la mano enguantada (Knox, 2016). Shinde y Gupta (2016) describieron este método de la siguiente forma: (1) agarrar el glande del pene, el cual es en forma de sacacorchos, con la mano enguantada, (2) ejercer presión en el glande del pene para estimular y provocar la eyaculación, (3) asegurar de mantener el agarre del pene hasta finalizada la eyaculación, (4) colectar el eyaculado en un termo, donde la primera fracción del eyaculado (pre-esperma) se descarta y la fracción de rica-esperma es la que se colecta. Dicho proceso puede tomar alrededor de 5 a 6 minutos. Es importante mencionar que una presión óptima debe ser provista durante la colección cuando esta técnica es usada (Shinde y Gupta, 2016) ya que este provee el estímulo para que ocurra la eyaculación. Una vez colectado, al semen se le realizan pruebas para garantizar su calidad.

2. Evaluación del semen

a. Características

La calidad del semen es un criterio básico para asegurar una producción con un alto número de crías (Schulze et al., 2014). Con el aumento en el uso de la IA, el poder asegurar la calidad del semen es de gran importancia (Schulze et al., 2013). Esto incluye características como lo son el volumen del eyaculado, concentración, porcentaje de espermatozoides móviles y morfología. La calidad del semen está estrechamente relacionada con la fertilidad del verraco (González-Peña et al, 2016). Así mismo, Knecht et al. (2013), concordaron en que la calidad y cantidad de semen eyaculado se puede determinar usando dichas características y en adición ayudan a determinar el número de dosis que se pueden obtener para IA.

Se considera que el eyaculado promedio contiene entre 60-120 billones de espermatozoides (Knox, 2016; Kozink et al., 2004), mientras que el volumen total de un eyaculado varía de 100 a 300 mL para cerdos jóvenes y 100 a 500+ mL para cerdos adultos (Kozink et al., 2004; Shipley, 1999). En los centros de IA se exige que el eyaculado debe tener una motilidad mayor de 70% y menos del 20% de espermatozoides anormales (Knox, 2016; Shipley, 1999). González-Peña et al. (2016) indicaron que el porcentaje de células morfológicamente anormales describe la maduración de los espermatozoides y funcionalidad del sistema reproductor masculino; mientras que la concentración de los espermatozoides impacta la cantidad de dosis que se pueden obtener de un eyaculado. Los verracos jóvenes (6-7 meses de edad) tienden a tener un mayor porcentaje de espermatozoides anormales en comparación con los adultos (Shipley, 1999).

b. Instrumentación para evaluar semen

La concentración del semen es crucial para determinar la tasa de dilución y optimizar la fertilidad durante la IA (Camus et al., 2011). La medida certera de la concentración del semen colectado es el primer y más importante paso para la preparación de la dosis final con el número deseado de espermatozoides que se utilizará en la IA. La concentración del semen se puede obtener utilizando un hematocitómetro o un fotómetro. La Organización de Salud Mundial especifica que el método más preciso para determinar la concentración del semen es usando el hematocitómetro, el cual es considerado como el “gold standard” (Hansen et al., 2006). Sin embargo, el hematocitómetro no es práctico para la certificación rutinaria de la concentración del semen ya que es trabajoso y lento (Hansen et al., 2006). Los fotómetros, por otra parte, son más rápidos, fáciles de usar y han demostrado ser exitosos para medir la concentración del semen (Knox, 2016; Shinde y Gupta, 2016). Recientemente se ha desarrollado un método más rápido y automatizado, el sistema CASA (“Computer Assisted Semen Analysis”), el cual ha revolucionado el procedimiento en la evaluación de semen en los grandes centros de IA (Knox, 2016). Con este sistema se pueden medir rápidamente de forma estandarizada las características del eyaculado como lo son motilidad, concentración, morfología y hasta calcular la tasa de dilución necesaria para preparar las dosis de semen (Knox, 2016; Amann y Waberski, 2014; Brokhuijse et al. 2011).

Tradicionalmente, la motilidad del semen era medida de forma visual en un microscopio de contraste de fases, creando una interpretación subjetiva, no estandarizada como es recomendado. El sistema CASA analiza alrededor de 400 células en una muestra de 3 μ L colocada

en una leja especializada, lo cual no es posible para un técnico de laboratorio analizando 2-3 campos microscópicos (Brokhuijse et al., 2011). El sistema CASA: (1) proyecta imágenes sucesivas de semen suspendido en una matriz, (2) detecta objetos basado en la intensidad de píxeles en un marco o esparcidor de luz y (3) usa un programa computarizado especial para extraer la información y producir la salida (Amann y Waberski, 2014). Brokhuijse et al. (2011) mencionan que las pruebas realizadas en CASA son estandarizadas para: (1) temperatura de muestra (alrededor de 39°C), (2) factor de dilución, (3) mezcla óptima entre semen y “buffer” de dilución usando un proceso mecánico para mezclar, (4) profundidad de la cámara de la laminilla, (5) adiestramiento óptimo de los técnicos que trabajan con el sistema y (6) uso de procesos operacionales estandarizados.

Brokhuijse et al. (2011) indicaron que algunas desventajas del sistema CASA son el alto costo de inversión y la necesidad de estandarizar y validar el sistema antes de que su uso práctico sea posible. A su vez, el sistema CASA no siempre puede discriminar entre espermatozoides inmóviles y otras células o partículas estáticas de tamaño similar en el semen, lo que podría resultar en una estimación de motilidad incorrecta (Brokhuijse et al., 2011). También pueden ocurrir errores al medir semen muy denso, ya que muchos de los espermatozoides colisionan o cruzan sus trayectorias (Brokhuijse et al., 2011). Además, el sistema CASA depende del adiestramiento apropiado del técnico de laboratorio, el cual es responsable de preparar la muestra y depositarla en la laminilla. La principal ventaja de este sistema es que permite un análisis objetivo de la motilidad de los espermatozoides en la muestra (Brokhuijse et al., 2011). Amann y Waberski (2014) mencionaron que algunos sistemas CASA más recientes detectan la presencia de la gota citoplasmática, colas dobladas o enrolladas y pueden evaluar la cabeza del espermatozoide y su estatus acrosomal. Esto es de gran beneficio para la unidad de producción de semen de verraco.

La mayoría de los laboratorios de espermatología y facilidades de procesamiento de semen están utilizando el sistema CASA (Amann y Waberski, 2014), confirmando así el rol tan importante que tiene este sistema en asegurar la calidad de semen mercadeado para IA en ganado vacuno, equinos y porcinos.

3. Factores que afectan la calidad del semen

El desempeño reproductivo de los verracos y la calidad del semen depende de varios factores como lo son la genética, edad, estado nutricional, tamaño testicular, frecuencia de colección y factores ambientales (Knecht et al., 2017b; Dong et al., 2016; Zasiadczyk et al., 2015; Smital, 2009). Estos factores han demostrado que afectan la producción del semen aproximadamente 25-30% a través del año (Fraser et al., 2016).

a. Genética

La raza del verraco afecta los parámetros cualitativos y cuantitativos del semen (Schulze et al., 2014). Algunos estudios han demostrado que la concentración de semen, el volumen del eyaculado y la morfología del espermatozoide varía considerablemente entre razas y composición genética (Žaja et al., 2016; Schulze et al., 2014; Flowers, 2008).

Hasta muy reciente, se creía que las razas cruzadas tenían mejores parámetros del semen que las puras. Sonderman y Luebbe (2008) y Flowers (2008) encontraron que cerdos de razas cruzadas usualmente producían la mayor calidad y cantidad de semen que sus contrapartes puros, seguido por los puros de razas terminales y, por último, puros de líneas maternas. Sonderman y Luebbe (2008) encontraron que luego de la primera colección, los verracos de líneas maternas tenían un retraso aproximado de 2-8 semanas para alcanzar el criterio mínimo de concentración y volumen, comparado con los verracos de líneas terminales (puras y cruzadas) de la misma edad, y necesitaban mayor tiempo de entrenamiento, esfuerzo, estímulo visual y competitivo para que estuviesen entrenados correctamente. Por otra parte, los verracos de razas cruzadas eran físicamente más duraderos y presentaban menos problemas de salud y estructurales al ponerse viejos (Sonderman y Luebbe, 2008).

Sin embargo, actualmente se ha demostrado que las razas puras usualmente alcanzan mejores resultados que las cruzadas, dependiendo del parámetro del semen que se esté midiendo (Knecht et al., 2017a). Varios investigadores han reportado que los verracos Duroc tienen un volumen de eyaculado significativamente menor, comparados con otras razas o cruces incluyendo: Large White, Yorkshire, Pietrain, Landrace, Hampshire, Landrace x Duroc, Landrace x Yorkshire, Duroc x Hampshire, Duroc x Pietrain y Hampshire x Pietrain (Schulze et al., 2014; Tretipskul et al., 2012; Smital et al., 2004). El mayor volumen de eyaculado ha sido encontrado en las razas

Yorkshire y Landrace (Schulze et al., 2014), Large White (Smital, 2004 y Ciereszko et al., 2000) y Landrace x Yorkshire (Tretipskul et al., 2012). A su vez, se ha reportado una relación inversamente proporcional entre el volumen del eyaculado y la concentración del semen (Tretipskul et al., 2012; Smital et al., 2004; Ciereszko et al., 2000), donde la raza con el mayor volumen de eyaculado produce la menor concentración de semen. Schulze et al. (2014) han encontrado que en verracos Duroc el porcentaje de espermatozoides anormales es mayor mientras que en Yorkshire y Landrace los porcentajes son menores.

b. Edad

La madurez sexual se alcanza entre los 9 a 10 meses de edad en la mayoría de los verracos (Knecht et al., 2017b). Esta se define como la presencia de espermatozoides en el eyaculado y la habilidad de preñar a la cerda (Kumaresan et al., 2011). La edad del verraco afecta significativamente el volumen del eyaculado, la concentración del semen y la morfología de los espermatozoides (Jankeviciute y Zilinskas, 2002, citados por Smital, 2009). Smital (2009) y otros investigadores (Kennedy y Wilkins, 1984; Banaszewska y Kondracki, 2012; Huang et al., 2010) citados por Knecht et al. (2017b) indicaron que los mejores resultados de producción de semen son alcanzados en verracos entre las edades de 2 a 3 años.

Sonderman y Luebbe (2008) observaron que verracos de 7-9 meses de edad producían eyaculaciones con poco volumen y baja concentración, esto asociado a una falta de madurez sexual. Fraser et al. (2016) reportaron que la colección de verracos maduros era de mejor calidad que las de verracos jóvenes, menores de 9 meses. Smital (2009) estableció que la concentración del semen aumenta rápidamente con la edad del verraco durante los primeros tres años, culminando a la edad de 3.5 años y luego comienza a declinar. Pinho (2013) y Sonderman y Luebbe (2008) indicaron que a mayor edad del verraco, el eyaculado contiene valores más bajos de concentración. Esto es atribuido a una mayor producción de plasma seminal, resultando en mayor volumen de semen y una mayor incidencia de espermatozoides con colas dobladas (Smital, 2009).

c. Estado nutricional

El estado nutricional y el consumo de alimento pueden afectar la eficiencia reproductiva en verracos. Este efecto es más evidente durante la exposición a altas temperaturas. Temperaturas del aire mayores de 30°C combinadas con un mayor peso corporal, provocan un menor consumo

de alimento en el verraco afectando su estado nutricional (Kunavongkrit et al., 2005). Durante los meses de verano, especialmente en el trópico, este efecto puede causar una inhibición en la espermatogénesis (Kunavongkrit et al. 2005; Levis y Reicks, 2005). El libido, la fertilidad y la producción y calidad del semen también pueden verse afectados por el estado nutricional del verraco (Wang et al., 2016; Levis y Reicks, 2005).

Los efectos detrimentales del estado nutricional sobre la espermatogénesis no son detectados inmediatamente, debido a que la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides en verracos toman alrededor de seis a siete semanas (Wilson et al., 2004). Luego de este periodo, se ha observado una disminución en la producción de espermatozoides asociado a una reducción en el consumo de energía (Wilson et al., 2004) y una disminución en el volumen del eyaculado (Louis et al., 1994; Wilson et al., 2004; Kemp et al., 1991, citados por Wang et al., 2016), libido (Wilson et al., 2004) y total de espermatozoides en el eyaculado (Kemp et al., 1991, citados por Wang et al., 2016) al restringir el consumo de proteína. Varios investigadores (Dong et al., 2016; Kunavongkrit et al., 2005; Stevermer et al., 1961, citados por Levis y Reicks, 2005; Louis et al., 1994) indicaron que dietas bajas en proteína cruda y un bajo consumo de energía pueden reducir significativamente el interés del verraco en montar el “dummy” y el evento de eyaculación. Sin embargo, dietas con contenido excesivo de proteína pueden causar un aumento en el número de espermatozoides anormales (Dong et al., 2016).

Kunavongkrit et al. (2005) recomendaron que para garantizar una alimentación apropiada durante los meses con temperaturas calientes, se tenga un horario de alimentación organizado y se use una formulación adecuada. En verracos adultos sexualmente activos, el NRC (1998) recomienda una dieta que contenga 13% de proteína cruda, 3400 kcal/kg de energía digerible (DE) y 3265 kcal/kg de energía metabolizable (ME).

Los cerdos tienen requisitos dietéticos para ciertos elementos inorgánicos como calcio, cloro, cobre, yodo, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, selenio, sodio, azufre y zinc (NRC, 1998). La función que estos elementos inorgánicos tienen sobre la reproducción del verraco varía entre ellos. Zinc desempeña un rol importante en las funciones de la próstata, epidídimo (Kumar et al., 2006) y testículo (Kumar et al., 2006; Wilson et al., 2004). Se ha reportado que zinc controla la motilidad del espermatozoide, estabiliza la membrana del espermatozoide (Kumar et al., 2006) e influye en el proceso de espermatogénesis (Kumar et al., 2006; Robinson et al. 1990).

Kumar et al. (2006) encontraron que al suplementar zinc en las dietas, aumentaba el volumen del eyaculado, la concentración del semen y el total de espermatozoides en el eyaculado. Por su parte, hipozincemia o deficiencia de zinc, retrasa el desarrollo testicular (NRC, 1998), causa disfunción de las gónadas, disminuye el peso testicular, atrofia los tubos seminíferos e inhibe la espermatogénesis (Kumar et al., 2006). Según el NRC (1998) se debe suplementar 50 mg de zinc por cada kg de alimento en la dieta.

Selenio y vitamina E también se han considerado importantes en la reproducción (Wilson et al., 2004). Selenio y vitamina E comparten roles antioxidantes (NRC, 1998), lo cual tiene un efecto en la maduración de los espermatozoides y la calidad del semen ya que se considera reducen el estrés y el daño a la membrana celular (Wilson et al., 2004). Marín-Guzmán et al. (1997) citados por Wilson et al. (2004) encontraron que cerdos consumiendo una dieta a la cual se le añadió 0.5 ppm de selenio mostraban un aumento en la concentración del semen, motilidad de los espermatozoides y tasa de fertilidad. Sin embargo, dicha cantidad está por encima de los niveles permitidos por las regulaciones actuales de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) que permite a fabricantes de alimento añadir hasta 0.3 ppm de selenio en los alimentos (Wilson et al., 2004; NRC 1998). Efectos similares han sido reportados para la vitamina E. Wang et al. (2016) señala que el suplementar con vitamina E mejoró el movimiento progresivo de los espermatozoides.

d. Tamaño testicular

Se ha encontrado que en verracos, hay una relación positiva entre el tamaño testicular y la producción y movimiento progresivo de espermatozoides (Owsiannyet al., 1998 y Ytournal et al., 2014, citados por Jacyno et al., 2015). Verracos seleccionados para mayor tamaño testicular producen 6×10^9 más espermatozoides por eyaculado que sus contrapartes de menor tamaño testicular, en apareamientos al azar con líneas control, representando un aumento de 10% en el número de espermatozoides producidos (Flowers, 2008). Otros investigadores han reportado que en verracos seleccionados para tamaño testicular, la concentración de testosterona es más elevada (Flowers, 2008). Los esteroides testiculares son necesarios para iniciar y mantener el comportamiento sexual y la testosterona tiene una función crucial en su rendimiento sexual (Pinho et al., 2013). Se espera que al seleccionar para mayor tamaño testicular se está seleccionando para

mayor libido y, por ende, un comportamiento sexual más intenso. Flowers (2008) indicó que el seleccionar para tamaño testicular es un enfoque válido para mejorar la espermatogénesis.

e. Frecuencia de colección

Un factor importante que afecta la cantidad y calidad del semen en IA es la frecuencia de colección (Frangež et al., 2005; Pruneda et al., 2005). Esta también afecta el proceso de espermatogénesis (Knecht et al., 2017b). Falkenberg et al. (1992) citado por Smital (2009) y González-Peña et al. (2016) indicaron que un intervalo entre colecciones óptimo para maximizar el total de semen producido de alta calidad fluctúa entre 2 a 5 días y que frecuencias mayores reducen el número de células espermáticas y el libido. González-Peña et al. (2016) indicaron que la frecuencia de colección afecta la calidad del semen y la fertilidad del verraco y sugirieron que reducir el periodo de descanso entre colecciones a 2 días resulta en una marcada disminución en la concentración y el volumen del eyaculado mientras que prolongarlo hasta 10 días resulta en un aumento de la concentración. Pruneda et al. (2005) y Frangež et al., (2005) reportaron que verracos sobre utilizados sexualmente mantienen menores concentración de espermatozoides, volumen de eyaculado, número de espermatozoides por eyaculado y porcentaje de motilidad. Pruneda et al. (2005), de igual manera, reportaron que verracos frecuentemente colectados poseen un menor porcentaje de espermatozoides móviles, mayor frecuencia de espermatozoides anormales (la forma de cabeza y colas, tamaño de la cabeza y número de cabezas y colas) y espermatozoides inmaduros (anomalías en la migración de la gota proximal). González-Peña et al. (2016) reportaron que 3 días de descanso entre colección fue lo más favorable según la perspectiva económica y fisiológica, ya que permite que el verraco pueda recuperar la reserva de espermatozoides mientras que el productor sigue generando dinero.

f. Factores ambientales

El manejo apropiado de los animales para asegurar una buena producción de semen bajo diferentes condiciones ambientales es una de las principales preocupaciones para los productores en países tropicales, así como en países con cambios drásticos en el clima. Estos cambios crean estrés en los animales afectando la calidad y producción de espermatozoides (Kunavongkrit et al., 2005). Los cerdos son particularmente susceptibles a condiciones ambientales calientes debido a su baja capacidad para disipar calor evaporativamente (Qu et al., 2016; Kunavongkrit et al., 2005)

y a su capa de grasa subcutánea, la cual afecta la disipación efectiva de calor (Qu et al., 2016). Es por esto que se hace de suma importancia entender el efecto que tiene el estrés calórico sobre su reproducción y su habilidad para enfrentarlo y así poder optimizar su desempeño (Rohrer et al., 2013).

La mayoría de los países en áreas tropicales poseen casi el mismo largo de día, aproximadamente 12 ± 1 hora, a través de todo el año y las temperaturas ambientales exceden los 30°C por varios meses al año (Suriyasomboon et al., 2004). Algunos investigadores señalan que, durante la época caliente, cuando la temperatura del aire alcanza los 30°C (86°F) y el largo del fotoperiodo no cambia mucho; la concentración de espermatozoides será menor, al igual que el volumen (Nardone et al., 2010; Sonderman y Luebbe, 2008). Sonderman y Luebbe (2008) añadieron que la espermatogénesis será negativamente afectada si dicha temperatura es acompañada por una humedad de 85%. Kunavongkrit et al. (2005) indicaron que además de afectar la espermatogénesis, también habrá un aumento en el porcentaje de espermatozoides mostrando cabezas anormales y gota citoplasmática proximal. Sin embargo, Suriyasomboon et al. (2004) concordaron que la disminución en la calidad del semen está asociada a un aumento en el porcentaje de espermatozoides anormales, pero sugieren que el volumen del eyaculado y el total de espermatozoides por eyaculado no se verá afectado.

De igual forma, se ha encontrado que el desempeño reproductivo a menudo es menor durante e inmediatamente luego de periodos calurosos (Kunavongkrit et al., 2005; Suriyasomboon et al., 2004). Esta disminución parece estar relacionada a una elevación en la temperatura corporal inducida por el estrés de calor (Suriyasomboon et al., 2004). Li et al. (2015) encontraron que elevadas temperaturas ambientales conducen a un aumento en la temperatura rectal y escrotal afectando el proceso de espermatogénesis. Esto provoca una reducción en la producción de semen y en la motilidad del espermatozoide y un aumento en la cantidad de espermatozoides anormales, deteriorando la calidad del semen. Debido al ciclo de espermatogénesis, estos efectos no serán detectados de inmediato, sino de 15 a 21 días luego de ser expuestos a elevadas temperaturas ambientales (Li et al., 2015). Algunos investigadores consideran que la temperatura escrotal óptima debe ser $2-8^{\circ}\text{C}$ por debajo de la temperatura corporal normal (Li et al., 2015; Suriyasomboon et al., 2004).

Nardone et al. (2010) sugirieron que la capacidad de los animales para enfrentar los desafíos térmicos cuando aumenta la temperatura ambiental resulta en una reducción en la producción de calor corporal, lograda disminuyendo el consumo de alimento, incrementando la tasa respiratoria, aumentando el consumo de agua, entre otras alteraciones.

4. Comportamiento sexual del verraco

El comportamiento sexual depende de la interacción entre los animales y su ambiente (Pinho et al., 2013). El repertorio del comportamiento sexual en verracos incluye una serie de características entre las que se pueden mencionar: salivación, masticación, olfatear y morder a la hembra o el “dummy”, orinar antes de montar, exponer el pene antes de la colección, monta y eyaculación. (Pinho et al. 2013; Levis y Reicks, 2005). El conocer el comportamiento sexual del macho es una herramienta importante para optimizar su rendimiento reproductivo (Pinho et al., 2013).

Flowers (2008) sugirió que el comportamiento sexual durante monta natural se mida exponiendo un verraco a una cerda en estro, mientras que en verracos utilizados para IA, se evalúe su comportamiento sexual basado en el interés por el “dummy”. Este comportamiento se evalúa de dos formas diferentes debido a que las hembras en celo proporcionan un mayor estímulo que un objeto inanimado (Flowers, 2008). Asimismo, la gran mayoría de los verracos utilizados para la IA casi no tienen contacto con hembras luego de que alcanzan la madurez sexual (Flowers, 2008). El interés mostrado por el verraco hacia las cerdas o el “dummy” se denomina como libido, lo cual es considerado como una de las características críticas para una reproducción exitosa (Pinho et al., 2013). Kunavongkrit et al. (2005) indicaron que el libido ausente o subnormal puede causar una disminución en la duración de la eyaculación, lo cual puede resultar en una menor producción de semen.

Algunos investigadores (Cameron, 1982 y Thiengtham, 1992, citados por Levis y Reicks, 2005) han evaluado el comportamiento sexual en verracos midiendo características como lo son: tiempo desde que entra a la jaula de colección hasta la primera monta en el “dummy”, duración entre primera monta y la extensión del pene, número de montas antes de comenzar la eyaculación y tiempo de duración de la eyaculación. Mientras que, Pinho et al. (2013) evaluaron comportamiento sexual observando montas falsas o incorrectas, mayormente en verracos jóvenes.

La genética del verraco y su edad han sido consideradas como factores que pueden afectar el comportamiento sexual. Flowers (2008) indicó que verracos con genética Duroc estaban menos interesados en la monta y más reacios a aparearse comparados con machos de la raza Yorkshire. También reportaron que verracos de razas cruzadas exhibían mayor líbido que sus contrapartes puros. Asimismo, fincas dedicadas a la colección de semen prefieren verracos jóvenes que se puedan entrenar fácilmente para la monta del “dummy” y colección del semen, lo cual puede tomar desde una semana hasta un mes (Estienne, 2014). El desarrollo de este comportamiento en verracos jóvenes puede ser afectado por el confinamiento y la restricción social (Kunavongkrit et al., 2005).

III. Objetivos

Diversos factores como la genética, edad, estado nutricional, tamaño testicular, frecuencia de colección y el ambiente, afectan la eficiencia reproductiva del verraco y, por ende, la calidad del semen y el comportamiento sexual. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones en esta área han sido realizados en climas templados donde ocurren cambios ambientales considerables a través de las épocas, mientras que el trópico usualmente se mantiene una temperatura alta constantemente, la cual puede causar estrés de calor en los animales durante todo el año. Por esta razón, en la presente investigación se evaluó el efecto de la edad, tiempo del día en que se colectaba y época del año sobre la calidad del semen y el comportamiento sexual de verracos criados en el trópico.

IV. Materiales y Métodos

A. Facilidades y animales

La presente investigación se realizó en las facilidades de la granja de cerdos de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico, localizada en el pueblo de Lajas. Se utilizaron dos verracos Yorkshire entrenados para la colección de semen. El primer cerdo, identificado como 91-1, tenía 5 años, pesó 563 lb al comienzo de la investigación y 546 lb al finalizar el experimento, un año después. El segundo cerdo, identificado como 32-6, tenía 2 años, pesó 470 lb y 491 lb al principio y al final de la investigación, respectivamente. El tamaño testicular para ambos cerdos fue estimado midiendo el largo y el ancho de cada testículo sobre la piel del escroto (Jacyno et al., 2015). Para el verraco 91-1 las medias fueron 8.7” de ancho y 14” de largo para el testículo izquierdo y para el testículo derecho 7” de ancho y 10.3” de largo. Para el verraco 32-6, el testículo izquierdo midió 4.5” de ancho y 15” de largo y el testículo derecho midió 5.5” de ancho y 11” de largo. Ambos verracos permanecieron durante toda la investigación en corrales individuales (9’2” x 4’8”) con paredes y pisos en cemento. Los verracos se sacaban solamente cuando eran llevados al corral donde se encontraba el “dummy” para hacer la colección de semen. Para evaluar la calidad del semen, se usaron las facilidades del laboratorio de biotecnología, localizado en el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Esta investigación tuvo una duración aproximada de un año, comenzando en enero de 2016 y culminando en diciembre del mismo año.

B. Época del año y temperatura ambiental

Los meses del año durante el periodo que duró la investigación fueron agrupados en dos categorías, época fresca y época caliente. Para esto, se tomó como referencia los datos históricos de la temperatura del aire reportada por “The Southeast Regional Climate Center” localizado en la Universidad de Carolina del Norte (SERCC, 2007) y los datos obtenidos en la Estación Meteorológica de la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico en Lajas. El SERCC (2007) tiene recopilado los datos para la temperatura del aire del pueblo de Lajas desde el año 1948 hasta el 2012 (Apéndice 1 y 2). Esto fue usado como referencia para conocer las fluctuaciones en la temperatura del aire a través de los meses en P.R. Los Apéndices 3 y 4 muestran los datos de temperatura del aire recopilados en la Estación Experimental Agrícola durante el año del experimento (2016).

Para propósitos de la presente investigación, los meses con una temperatura promedio menor de 26.67°C (80°F) fueron agrupados en época fresca, mientras que los meses con una temperatura promedio igual o mayor de 26.67°C, fueron agrupados en época caliente. Se usó como criterio la temperatura promedio del aire según los datos tomados por la Estación Experimental Agrícola. Basado en estos datos, los meses de noviembre a abril fueron clasificados en época fresca, mientras que los meses de mayo a octubre se clasificaron en la época caliente.

El día de la colección, se colocaron 3 sensores (HOBO[®] U23 Pro v2 Temperature / relative humidity Data Loggers, Onset Computer Corporation, Pocasset, MA) en la parte superior dentro del corral donde se localizaba el “dummy”, aproximadamente 5’ a 5’7” del piso. Se colocó uno sobre la entrada del corral y los otros dos en las esquinas opuestas a la entrada del corral. Estos registraban la temperatura del aire (Apéndices 5 y 6) y la humedad relativa (Apéndices 7 y 8) cada 5 minutos.

C. Colección de Semen

Previo a la colección, se sacaba al verraco de su corral y se llevaba a otro corral donde se encontraba una estructura de tubos (“dummy”) diseñada para que el verraco la montara. Se procedió a tomar el tiempo con un cronómetro, desde que el verraco entraba al corral hasta que finalizaba la eyaculación. El tiempo fue clasificado en tres etapas: (a) pre-monta, la cual consistía en el tiempo que tomaba desde que entraba al corral hasta que iniciaba la primera monta en el “dummy”; (b) monta, incluyendo desde el inicio de la primera monta hasta que comenzaba la eyaculación y, por último, (c) eyaculación, que consistía del tiempo que duró la eyaculación. El semen se colectó utilizando el método de la mano enguantada. Este método consistió en ejercer presión al glande con la mano hasta lograr la eyaculación. El semen era recolectado en un termo al cual previamente se le habían colocado gazas en la boquilla para separar la fase gelatinosa y evitar la entrada de contaminantes como pelos. Cada verraco se colectó dos veces por semana, los lunes por la tarde y los jueves en la mañana, en semanas alternas con una semana de descanso.

Durante la colección se midió la temperatura rectal del verraco con un termómetro digital (Vicks[®] ComfortFlex[®]) en grados Celsius (+/-0.11°C). Esta fue utilizada como indicador de la temperatura corporal (Blainey, 1974).

D. Volumen y concentración

Una vez colectado, el semen era llevado al laboratorio ubicado en la granja de Lajas para su evaluación. Allí se midió el volumen total del semen filtrado y su concentración. El volumen se midió utilizando un matraz calibrado en mililitros, mientras que la concentración se midió con un espectrofotómetro (SpermaCue® Minitube; Delavan, WI) calibrado para semen de cerdo. Las unidades del espectrofotómetro eran presentadas en millones por mililitro. Una muestra del semen colectado (25mL) era echada en una botella de inseminación, se envolvía con papel toalla y se transportaba hacia el laboratorio de biotecnología localizado en el Departamento de Ciencia Animal, Recinto de Mayagüez. Dicho viaje tomaba alrededor de 50 minutos en carro. Durante el transporte, la botella estaba envuelta en papel toalla y se colocaba cerca de la ingle, de tal forma para evitar cambios drásticos en la temperatura del semen.

E. Análisis en CASA

Una vez en el laboratorio de biotecnología del Departamento de Ciencia Animal, la botella con el semen se colocó en un baño de María a 37°C. En la plancha de calentamiento, previamente ajustada para calentar a 37°C, se colocó un microtubo con diluyente (Easybuffer B®). La cantidad necesaria de diluyente fue determinada usando la Ecuación 2. Una vez el microtubo alcanzaba los 37°C, se añadía el semen (cantidad determinada usando la Ecuación 1) y se mezclaba en un vórtice mecánico a 80% de su velocidad por 3 segundos. De este semen diluido se tomó una muestra de 3µL y se colocó en una de las cuatro cámaras de conteo estandarizadas de una laminilla Leja® (IMV Technologies®, Maple Grove, MN). La laminilla fue introducida en el microscopio trinocular y se analizó usando el programa “Computer-Assisted Semen Analysis” (CASA, por sus siglas en inglés) IVO II™ (Hamilton Thorne Inc., 2014). Se obtuvieron datos de concentración, morfología (porcentaje de normalidad) y movimiento progresivo para cada muestra analizada.

Para obtener una lectura precisa del equipo CASA se recomienda que la concentración de la muestra sea alrededor de 30×10^6 espermatozoides/mL (Zasiadczyk et al., 2015). Para determinar el volumen de semen necesario para lograr esta concentración se utilizó la ecuación obtenida de las notas del curso INPE 5055 Biotecnología Animal (Dr. Esbal Jiménez, Departamento de Ciencia Animal):

$$V_S = (V_M \times C_M) \div C_S \text{ (Ecuación 1)}$$

donde:

V_S = volumen de semen crudo necesario para obtener lectura en CASA

V_M = volumen final de muestra a ser utilizada (diluyente + semen crudo, 500 μ L)

C_M = concentración final deseada de muestra (30 X 10⁶ espermatozoides/mL)

C_S = número de espermatozoides por mililitro (medido por el SpermaCue[®]) en semen crudo

La cantidad de diluyente necesaria para añadir a la muestra final fue estimada utilizando la siguiente ecuación:

$$V_{BB} = V_M - V_S \text{ (Ecuación 2)}$$

donde:

V_{BB} = volumen de Easybuffer B[®]

V_M = volumen final de muestra a ser utilizada (diluyente + semen crudo, 500 μ L)

V_S = volumen de semen crudo necesario para obtener lectura en CASA (medido en la Ecuación 1)

El equipo CASA requiere que se especifique en el programa el factor de dilución utilizado. En la presente investigación se utilizaron dos fórmulas diferentes para calcular el factor de dilución. La primera ecuación utilizada fue denominada factor de dilución 1 (FD1) obtenida de las notas del curso INPE 5055 Biotecnología Animal (Dr. Esbal Jiménez, Departamento de Ciencia Animal):

$$FD_1 = C_S \div C_M$$

donde:

FD_1 = factor de dilución 1

C_S = concentración del semen (medido por el SpermaCue[®])

C_M = concentración final deseada de muestra (30 x 10⁶ espermatozoides/mL)

A mediados de la investigación se utilizó además la ecuación recomendada por el manual del sistema CASA (Hamilton Thorne Inc., 2014) para calcular el factor de dilución, denominada como factor de dilución 2 (FD2):

$$FD_2 = V_{BB} \div V_S$$

donde:

FD₂ = factor de dilución 2

V_{BB} = volumen de Easybuffer B[®] añadido a la muestra final (volumen de diluyente)

V_S = volumen de semen crudo necesario para obtener lectura en CASA (medido en la Ecuación 1)

F. Análisis estadísticos

El diseño experimental utilizado en la presente investigación fue un arreglo factorial 2x2x2 donde se evaluaron los siguientes factores: la edad del verraco al comienzo de la investigación (5 o 2 años), tiempo del día (AM o PM) y época del año (fresca o caliente). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el procedimiento GLIMMIX (SAS[®], 2014). Se estableció el nivel de significancia de $P \leq 0.10$ para detectar diferencias entre las variables analizadas. Interacciones con valor de $P \geq 0.4$ fueron eliminadas del modelo final, así como variables con datos incompletos.

1. Calidad del semen

Para determinar el efecto de la edad de los verracos, tiempo del día en que fueron colectados y la época del año sobre las variables de calidad del semen analizadas: concentración del semen (número de espermatozoides/mL), total de espermatozoides en semen filtrado, porcentaje de espermatozoides normales y porcentaje de movimiento progresivo, durante el periodo experimental, se realizó un análisis de covarianza (SAS[®], 2014). La temperatura rectal del verraco al momento de ser colectado y el volumen total del semen filtrado fueron utilizados como covariables. El siguiente modelo estadístico fue utilizado:

$$Y_{ijkm} = \mu_{ijk} + \alpha_i + \gamma_j + \delta_k + \alpha\gamma_{ij} + \alpha\delta_{ik} + \gamma\delta_{jk} + \alpha\gamma\delta_{ijk} + \beta_{1X1ijk} + \beta_{2X2ijk} + \epsilon_{ijkm}$$

donde:

Y_{ijkm} = concentración del semen sin diluir medido por SpermaCue® y en el sistema CASA, concentración del semen diluido en factor de dilución 1 y 2 en CASA, total de espermatozoides en semen filtrado utilizando la concentración obtenida en SpermaCue®, total de espermatozoides en semen utilizando la concentración obtenida con el sistema CASA sin diluir y con el factor de dilución 1 y 2, porcentaje de espermatozoides normales en semen sin diluir y diluido en factor de dilución 1 y 2 en sistema CASA, porcentaje de movimiento progresivo de espermatozoides en semen sin diluir, diluido en factor de dilución 1 y 2 en el sistema CASA.

μ_{ijk} = media poblacional

α_i = efecto de la edad del verraco (2 ó 5 años)

γ_j = efecto del tiempo del día (AM o PM)

δ_k = efecto de la época del año (fresca o caliente)

$\alpha\gamma_{ij}$ = interacción entre edad y tiempo del día

$\alpha\delta_{ik}$ = interacción entre edad y época del año

$\gamma\delta_{jk}$ = interacción entre tiempo del día y época del año

$\alpha\gamma\delta_{ijk}$ = interacción entre edad, tiempo del día y época del año

$\beta_{1,2}$ = coeficiente de regresión para las covariables

x_{1ijk}, x_{2ijk} = covariables: temperatura rectal (°C) y volumen total (mL) de semen filtrado

ϵ_{ijkm} = error experimental

El volumen total de semen filtrado fue analizado usando el mismo modelo, pero eliminándolo como covariable. Para comparar los dos métodos utilizados para medir la concentración de semen sin diluir, se utilizó el modelo anterior y se le añadió la variable método de análisis (SpermaCue® y CASA) como factor principal y sus respectivas interacciones (edad del verraco x método, tiempo del día x método, época del año x método, edad del verraco x tiempo del día x método, edad del verraco x época del año x método, tiempo del día x época del año x método y edad del verraco x tiempo del día x época del año x método).

2. Comportamiento sexual

Para determinar el efecto de la edad del verraco, tiempo del día al cual era colectado y época sobre la duración de Pre-Monta, Monta y Eyaculación se realizó un análisis de covarianza (SAS, 2014). Los datos de duración (segundos) fueron transformados a logaritmo utilizando el siguiente comando del programa SAS: $\log\text{var} = \log(\text{var}+1)$ (obtenida de las notas del curso AGRO 6005 “Use of Statistical Software in Biometry”, Dr. Raúl E. Macchiavelli, Departamento de Ciencias Agroambientales). La temperatura del aire y humedad relativa dentro del corral al momento de colectar el verraco y su temperatura rectal se consideraron como covariables. Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu_{ijk} + \alpha_i + \gamma_j + \delta_k + \alpha\gamma_{ij} + \alpha\delta_{ik} + \gamma\delta_{jk} + \alpha\gamma\delta_{ijk} + \beta_1 X_{1ijk} + \beta_2 X_{2ijk} + \beta_3 X_{3ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijkl} = duración de pre-monta, monta y eyaculación

μ_{ijk} = media poblacional

α_i = efecto edad del verraco (5 ó 2 años)

γ_j = efecto tiempo del día (AM o PM)

δ_k = efecto de época del año (fresca o caliente)

$\alpha\gamma_{ij}$ = interacción entre edad y tiempo del día

$\alpha\delta_{ik}$ = interacción entre edad y época del año

$\gamma\delta_{jk}$ = interacción entre tiempo del día y época del año

$\alpha\gamma\delta_{ijk}$ = interacción entre edad, tiempo del día y época del año

$\beta_{1,2,3}$ = coeficiente de regresión para las covariables

$X_{1ijk}, X_{2ijk}, X_{3ijk}$ = temperatura del aire (°C) dentro del corral, humedad relativa (%) dentro del corral y temperatura rectal (°C) como covariables

ε_{ijkl} = error experimental

3. Temperatura rectal

La temperatura rectal del verraco durante la colección se consideró como covariable para el análisis de calidad de semen y comportamiento sexual. En adición, la temperatura rectal se analizó como variable para detectar si fue estadísticamente afectada por la edad del verraco, tiempo del día y época al cual fue colectado, usando un análisis de varianza (SAS[®], 2014). Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu_{ijk} + \alpha_i + \gamma_j + \delta_k + \alpha\gamma_{ij} + \alpha\delta_{ik} + \gamma\delta_{jk} + \alpha\gamma\delta_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijkl} = temperatura rectal ($^{\circ}\text{C}$)

μ_{ijk} = media poblacional

α_i = efecto edad de verraco (5 ó 2 años)

γ_j = efecto tiempo del día (AM o PM)

δ_k = efecto de época del año (fresca o caliente)

$\alpha\gamma_{ij}$ = interacción entre edad y tiempo del día

$\alpha\delta_{ik}$ = interacción entre edad y época del año

$\gamma\delta_{jk}$ = interacción entre tiempo y época del año

$\alpha\gamma\delta_{ijk}$ = interacción entre edad, tiempo del día y época del año

ε_{ijkl} = error experimental

4. Regresiones

Se realizó un análisis de regresión (Proc REG en SAS[®], 2014) para las covariables significativas en los modelos de calidad de semen y comportamiento sexual. Al hacer el análisis de regresión (concentración del semen y concentración total de espermatozoides) para el verraco joven, se eliminaron datos marginales. El coeficiente de correlación (r) entre los parámetros analizados fue calculado usando la correlación de Pearson (Proc CORR en SAS[®], 2014). Para este propósito se usó el siguiente modelo:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_{1X1i} + \beta_{1X1i^2} + \beta_{2X2i} + \beta_{2X2i^2} + \beta_{3X3i} + \beta_{3X3i^2} + \varepsilon_i$$

donde:

Y_i = concentración del semen, total de espermatozoides en semen colectado, porcentaje de espermatozoides normales, porcentaje de movimiento progresivo, volumen del eyaculado y la duración de pre-monta, monta y eyaculación.

β_0 = intercepto en Y

$\beta_{1,2,3}$ = pendiente, el cambio en Y, cuando xi cambia una unidad y las demás variables se mantienen iguales

$x_{1,2,3}$ = variables regresoras; temperatura rectal (°C), volumen del eyaculado, temperatura del aire (°C), humedad relativa (%) dentro del corral. Las variable regresoras que se utilizaron dependieron de la variable que se estaba analizando

$x_{1,2,3i}^2$ = variables regresoras al cuadrado; temperatura rectal al cuadrado, volumen del eyaculado al cuadrado, temperatura del aire al cuadrado, humedad relativa dentro del corral al cuadrado. Las variable regresoras que se utilizaron dependieron de la variable que se estaba analizando

ε_i = error experimental

V. Resultados y discusión

Del total de muestras posibles para cada verraco (50 para el verraco 32-6 y 51 para el verraco 91-1) solo se pudieron coleccionar treinta y seis para el verraco 32-6 y cuarenta y seis para el verraco 91-1. La diferencia en el número de muestras fue debida en algunas ocasiones, a una falta de interés por parte del verraco hacia el “dummy”. De las muestras coleccionadas, algunas no pudieron ser analizadas en CASA, por falta de acceso a este equipo en Mayagüez. Los datos incompletos fueron excluidos del análisis estadístico. De los datos completos que sí se pudieron analizar, se obtuvieron los siguientes resultados.

A. Calidad del semen

La calidad del semen se evaluó usando los siguientes criterios: concentración del semen, concentración total de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides normales y movimiento progresivo y volumen total del semen filtrado. Además, se comparó el método utilizado (SpermaCue® vs CASA) sobre la concentración del semen sin diluir.

1. Concentración del semen

La concentración de semen sin diluir no pudo ser analizada por CASA para todas las muestras de los verracos. Del total de muestras crudas analizadas por Spermacue® (81) solo se pudieron analizar 31 en el CASA. La diferencia en el número de muestras analizadas se debió mayormente a que el semen del verraco joven era altamente concentrado y el equipo CASA no lograba leer a menos que este se diluyera. Zasiadczyk et al. (2015) recomendaron que la concentración de la muestra sea alrededor de 30×10^6 espermatozoides/mL para obtener una lectura precisa en el equipo de CASA.

El efecto de la interacción edad del verraco x tiempo del día en que se coleccionó sobre la concentración de semen se presenta en la Tabla 1. La concentración de semen, según medida por el SpermaCue®, fue mayor ($P=0.02$) cuando el verraco joven era coleccionado en la tarde ($373.6 \pm 23.3 \times 10^6$ /mL). Sin embargo, este efecto no fue observado en el verraco mayor, el cual no mostró diferencias en la concentración de semen ya fuera coleccionado en la mañana o en la tarde ($P>0.10$). El verraco joven mostró la mayor concentración de semen independientemente de si era coleccionado en la mañana o en la tarde, cuando se comparó con el verraco mayor (Tabla 1). Esto concuerda con lo obtenido por otros investigadores (Knecht et al., 2017b; Wang et al., 2017; Pinho, 2013;

Smital, 2009; Sonderman y Luebbe, 2008) los cuales han encontrado que la concentración del semen aumenta con la edad hasta los 2 o 3 años, alcanzando la producción óptima de espermatozoides y luego comienza a disminuir. El aumento en la concentración del semen con la edad probablemente es causado por el desarrollo y crecimiento de los testículos (Wang et al., 2017), mientras que la reducción luego de la producción óptima de espermatozoides puede deberse a un aumento en la producción de plasma seminal (Pinho, 2013; Sonderman y Luebbe, 2008). Los verracos en la presente investigación tenían 2 y 5 años de edad, lo cual puede explicar la diferencia en la concentración de espermatozoides observada entre los animales.

La interacción edad del verraco x tiempo del día también afectó la concentración de semen cuando este fue evaluado por el factor de dilución 1 (FD1, P=0.001) y factor de dilución 2 (FD2, P=0.004). El verraco joven obtuvo la mayor concentración del semen cuando era colectado en las tardes para ambos FD1 y FD2 (401.55 ± 55.45 y $536.37 \pm 67.07 \times 10^6/\text{mL}$ para FD1 y FD2, respectivamente). No se observaron diferencias entre el verraco joven cuando era colectado en la mañana y el verraco mayor (Tabla 1) ya fuera este colectado en la mañana o en la tarde.

Tabla 1. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x tiempo del día en que se colectó sobre la concentración del semen (número de espermatozoides x $10^6/\text{mL}$) en diferentes diluciones.

<i>Edad del verraco</i> x <i>Tiempo del día</i>	<i>Concentración del semen (número de espermatozoides x $10^6/\text{mL}$)*</i>			
	5 años		2 años	
	AM	PM	AM	PM
SpermaCue®	84.6 ± 22.2^a n=21	76.3 ± 17.9^a n=24	302.2 ± 21.0^b n=21	373.6 ± 23.3^c n=15
FD1	136.92 ± 55.44^a n=18	54.12 ± 44.62^a n=21	183.52 ± 48.74^a n=18	401.55 ± 55.45^b n=13
FD2	114.35 ± 74.37^a n=11	65.87 ± 59.37^a n=14	258.47 ± 67.22^a n=13	536.37 ± 67.07^b n=9

*LSM \pm error estándar, n = número de observaciones

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel $P \leq 0.10$

La interacción edad de verraco x época del año en que se colectó (Tabla 2) afectó la concentración de semen, según medida por el SpermaCue® (P=0.002) y FD2 (P=0.06). Para el semen evaluado por SpermaCue®, el verraco joven mostró la mayor concentración de semen cuando era colectado durante la época fresca ($406.4 \pm 22.4 \times 10^6/\text{mL}$). Knecht et al. (2017b) reportaron resultados similares, donde la mayor concentración del semen se obtuvo en los verracos

jóvenes (10-12 meses) durante el otoño, que representa una época fresca. Por su parte, Fraser et al. (2016) indicaron que solo en verracos de 8-18 meses de edad, la concentración del semen era significativamente mayor durante el periodo otoño-invierno (fresco / disminución de temperatura) en comparación con el periodo primavera-verano (caliente / aumento de temperatura). Sin embargo, al igual que Knecht et al. (2013), Fraser et al. (2016) no encontraron un efecto significativo de la época del año sobre la concentración del semen cuando se compararon verracos de edades mayores (8-30 meses). En la presente investigación, tampoco se encontraron diferencias significativas en la concentración de semen para el verraco mayor cuando era colectado ya fuera durante la época fresca o caliente. Sin embargo, los valores para concentración de semen encontrados en el verraco mayor son menores a lo reportados por Knecht et al. (2017b), quienes encontraron valores de $370.21 \pm 152.25 \times 10^6/\text{mL}$ para verracos mayores de 30 meses. En la presente investigación, el verraco joven mostró consistentemente la mayor concentración de semen, tanto en la época fresca como en la caliente, cuando se comparó con el verraco mayor. Por otra parte, Ogbu et al. (2014) reportaron una diferencia significativa en la concentración del semen entre verracos jóvenes (6 meses) expuestos a temperaturas ambientales de $27.7\text{-}28.7^\circ\text{C}$ ($181.99 \pm 2.07 \times 10^6/\text{mL}$), verracos expuestos a $39.9\text{-}41.06^\circ\text{C}$ por 45 min. ($141.72 \pm 4.02 \times 10^6/\text{mL}$) y verracos expuestos a $39.9\text{-}41.06^\circ\text{C}$ por 60 min. ($134.37 \pm 3.45 \times 10^6/\text{mL}$). Estos valores se encuentran por debajo de los encontrados en la presente investigación para el verraco joven durante la época caliente, cuando se esperaría que esté bajo estrés de calor, aunque sí se pudo observar una disminución en la concentración durante la época caliente. Un aumento en la temperatura del aire por encima de los límites de la zona termoneutral (aproximadamente 28°C) puede causar estrés de calor en verracos (Ogbu et al., 2013; Lammers et al., 2007), resultando en una disminución en la concentración del semen (Ogbu et al., 2014). En la presente investigación, a pesar de que la temperatura promedio no alcanzó los 28°C durante los meses de la época caliente, la temperatura máxima sí sobrepasó estos valores (Apéndice 3), lo que pudiese explicar la reducción en la concentración de semen para el verraco joven durante esta época.

Asimismo, cuando el semen era evaluado en FD2, se observaron valores mayores para el verraco joven cuando este era colectado durante la época fresca ($537.12 \pm 75.11 \times 10^6/\text{mL}$, $P=0.06$, Tabla 2). Sin embargo, no se observaron diferencias en la concentración del verraco joven colectado durante la época caliente y la del verraco mayor durante la época fresca ($P>0.10$). La

concentración de semen del verraco mayor no fue diferente independientemente de si era colectado durante la época fresca o caliente.

Knecht et al. (2017b) recomendaron valores de $300 \times 10^6/\text{mL}$ como parámetro estándar para evaluar la concentración del semen, indicando que valores menores a este deben ser considerados como de baja concentración. En la presente investigación, el verraco mayor nunca alcanzó una concentración cercana a este valor durante el periodo experimental, mientras que el verraco joven sobrepasó este estándar cuando era colectado en las tardes (Tabla 1) y en la época fresca (Tabla 2).

Tabla 2. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre la concentración del semen (número de espermatozoides x $10^6/\text{mL}$) en diferentes diluciones.

<i>Edad del verraco</i> x <i>Época del año</i>	<i>Concentración del semen (número de espermatozoides x $10^6/\text{mL}$)*</i>			
	5 años		2 años	
	Fresca	Caliente	Fresca	Caliente
SpermaCue®	91.7±21.6 ^a n=22	69.3±16.4 ^a n=23	406.4±22.4 ^b n=17	269.4±20.9 ^c n=19
FD2	118.87±82.99 ^{ac} n=6	61.35±42.20 ^a n=19	537.12±75.11 ^b n=5	257.72±45.04 ^c n=17

*LSM ± error estándar, n = número de observaciones

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel $P \leq 0.10$

La interacción época del año en que se colectó x tiempo del día, influyó ($P=0.06$) la concentración del semen según medido por FD2. La concentración fue mayor durante la época fresca, ya fueran colectados en las tardes o en las mañanas (436.83 ± 60.56 y $219.16 \pm 76.19 \times 10^6$ espermatozoides/mL en la tarde y en la mañana, respectivamente). Sin embargo, la concentración del semen colectado durante la época fresca por la mañana no fue diferente ($P > 0.10$) del colectado en la época caliente ya fuera en la mañana o en la tarde. Suriyasomboon et al. (2004) encontraron que las variaciones en la producción de semen a través de las épocas del año eran causadas mayormente por variaciones en la temperatura y humedad del aire. Además, encontraron que la temperatura y humedad diaria, mostraban el mismo patrón de variación a través de las diferentes épocas del año, donde la temperatura máxima y la humedad mínima se alcanzaban en la tarde, siendo este periodo considerado el más caliente del día. En la presente investigación, la mayor concentración del semen se obtuvo cuando los verracos eran colectados en la tarde durante la época

fresca. Ni la época del año en que se colectó el verraco, ni sus respectivas interacciones, mostraron un efecto ($P>0.10$) sobre la concentración del semen según evaluado por CASA usando FD1.

2. Total de espermatozoides en semen filtrado

Al igual que para la concentración del semen, el total de espermatozoides en el semen filtrado sin diluir, no pudo ser analizado por CASA para todas las muestras de los verracos, debido mayormente a la alta concentración del semen del verraco joven.

El total de espermatozoides en semen filtrado para FD1 y FD2 según evaluado por CASA fue afectado ($P\leq 0.01$) por la interacción edad del verraco x tiempo del día en que se colectó (Tabla 3). Para el semen diluido en FD1, el total de espermatozoides fue mayor para el verraco joven cuando era colectado en la tarde ($85770\pm 4246.14 \times 10^6$, $P=0.01$), mientras que el verraco mayor tuvo el menor número de espermatozoides en ese momento ($12604\pm 4246.14 \times 10^6$). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Schulze et al. (2014) quienes reportaron que el total de espermatozoides por eyaculado aumentaba con la edad del verraco. El total de espermatozoides para el verraco joven y el mayor no fue diferente ($P>0.10$) cuando fueron colectados en la mañana. Asimismo, el total de espermatozoides del verraco mayor no fue afectado ($P>0.10$) por el tiempo del día en que fue colectado.

Cuando el total de espermatozoides fue analizado para el FD2, se obtuvieron resultados similares, siendo el verraco joven el que mostró la mayor cantidad de espermatozoides cuando era colectado en la tarde (Tabla 3, $P=0.004$). Varios investigadores (Knecht et al., 2017b; Wang et al., 2017; Pinho, 2013; Smital, 2009; Sonderman y Luebbe, 2008) indicaron que la producción total de espermatozoides alcanza su valor máximo cuando el verraco tiene alrededor de tres años de edad, la cual es cercana a la edad del verraco joven en la presente investigación.

Tabla 3. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x tiempo del día en que se colectó sobre el total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10⁶) en diferentes diluciones (FD1 y FD2).

Edad del verraco x Tiempo del día	Total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10 ⁶)*			
	5 años		2 años	
	AM	PM	AM	PM
FD1	25574±4246.14 ^{ab} n=21	12604±4246.14 ^a n=24	49423±4246.14 ^b n=20	85770±4246.14 ^c n=15
FD2	9728.46±4209.11 ^a n=11	6690.46±4209.11 ^a n=14	62817±4209.11 ^b n=13	124530±4209.11 ^c n=9

*LSM ± error estándar, n = número de observaciones

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel P≤0.10

La interacción edad del verraco x época del año en que se colectó, tuvo un efecto sobre el total de espermatozoides del semen filtrado según evaluado por SpermaCue[®] (P=0.07) y FD2 (P=0.04, Tabla 4). En ambos caso, se observó que el verraco joven tenía el mayor total de espermatozoides, independientemente de si era colectado en la época fresca o caliente, cuando se comparó con el verraco mayor (Tabla 4). Asimismo, el verraco joven produjo el mayor total de espermatozoides durante la época fresca (94572±2581.0 y 118374±4209.11 x 10⁶ para SpermaCue[®] y FD2, respectivamente). Esto concuerda con lo reportado por otros investigadores (Frydrychova et al., 2007 citado por Ogbu et al., 2014; Kunavongkrit et al., 2005) quienes han encontrado que el total de espermatozoides es mayor durante los meses frescos comparado con los calientes. Sin embargo, este efecto no fue observado para el verraco mayor, el cual no mostró diferencia (P>0.10) en el total de espermatozoides, ya fuera colectado en la época fresca o en la caliente. A pesar de que el volumen total del semen filtrado durante la época fresca fue menor para el verraco joven (P≤0.10, Tabla 7), el total de espermatozoides fue mayor (P≤0.10, Tabla 4) posiblemente asociado a un mayor número de espermatozoides por mililitro (P≤0.10, Tabla 2).

Tabla 4. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre el total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10⁶) en diferentes diluciones.

Edad del verraco x Época del año	Total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10 ⁶)*			
	5 años		2 años	
	Fresca	Caliente	Fresca	Caliente
SpermaCue®	16284±2581.0 ^a n=22	16632±2581.0 ^a n=23	94572±2581.0 ^b n=16	75108±2581.0 ^c n=19
FD2	8741.41±4209.11 ^a n=6	7677.51±4209.11 ^a n=19	118374±4209.11 ^b n=5	68974±4209.11 ^c n=17

*LSM ± error estándar, n = número de observaciones

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel P≤0.10

El total de espermatozoides en semen filtrado según evaluado por SpermaCue®, fue afectado (P≤0.05) por la interacción época del año x tiempo del día en que se colectó (Tabla 5), siendo mayor en la mañana que en la tarde durante la época fresca (59381±2581.0 vs 39009±2581.0 x 10⁶, respectivamente). Sin embargo, no se encontró diferencia asociada al tiempo del día cuando eran colectados en la época caliente o en las mañanas durante la época fresca (P>0.10). Por otra parte, el total de espermatozoides en semen filtrado evaluado en FD2, fue mayor durante la época fresca cuando eran colectados en la tarde (88236±4209.11 x 10⁶, P=0.06). No se encontraron diferencias (P>0.10) entre el total de espermatozoides para semen filtrado durante la época fresca por la mañana vs la época caliente. El total de espermatozoides según evaluado por FD1, no fue afectado (P>0.10) por la época del año ni sus respectivas interacciones.

Tabla 5. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción época del año x tiempo del día en que se colectó sobre el total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10⁶) en diferentes diluciones.

Época del año x Tiempo del día	Total de espermatozoides (número de espermatozoides x 10 ⁶)*			
	Fresca		Caliente	
	AM	PM	AM	PM
SpermaCue®	59381±2581.0 ^a n=20	39009±2581.0 ^b n=18	51474±2581.0 ^{ab} n=21	52732±2581.0 ^{ab} n=21
FD2	38879±4209.11 ^a n=5	88236±4209.11 ^b n=6	33667±4209.11 ^a n=19	42984±4209.11 ^a n=17

*LSM ± error estándar, n = número de observaciones

^{a,b} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel P≤0.10

3. Porcentaje de normalidad y movimiento progresivo de espermatozoides evaluados en CASA

El porcentaje de normalidad en semen diluido en FD1 fue afectado ($P=0.08$) por la interacción edad del verraco x tiempo del día en que se colectó. El verraco mayor mostró el mayor porcentaje de normalidad ($76.25\pm 3.10\%$) cuando era colectado en las tardes, aunque esto no fue significativamente diferente a la colección de la mañana. Esto contrasta con lo reportado por otros investigadores (Smital, 2009; Wolf y Smital, 2009), quienes han encontrado una reducción en el porcentaje de espermatozoides normales a lo largo de la vida reproductiva en verracos, asociado a una mayor incidencia de anomalías en la cabeza y colas y aumento de espermatozoides con gota citoplásmica proximal (Smital, 2009; Malmgren, 1988, citado por Kunavongkrit et al., 2005). No se encontró diferencias significativas entre el porcentaje de normalidad para el verraco mayor cuando era colectado en la mañana ($67.92\pm 3.73\%$) y el verraco joven, sin importar el tiempo en que fuera colectado (60.63 ± 3.29 y $58.39\pm 3.73\%$, para AM y PM, respectivamente).

La época del año (fresca o caliente) ni sus respectivas interacciones tuvieron un efecto ($P>0.10$) sobre el porcentaje de normalidad para el semen evaluado en FD1. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones revisadas coinciden sobre el efecto detrimental que tiene la época caliente sobre el porcentaje de normalidad (Fraser et al., 2016; Pinho et al., 2013; Tretipskul et al., 2012; Kunavongkrit et al., 2005) indicando que la exposición a temperaturas calientes afectaba negativamente el proceso de espermatogénesis. Cuando el porcentaje de espermatozoides normales en semen sin diluir fue evaluado en CASA, el verraco mayor mostró los valores más altos (58.36 ± 2.10 vs $44.64\pm 6.03\%$, $P=0.006$, para el verraco mayor vs el joven, respectivamente). Por otra parte, el porcentaje de normalidad para el semen evaluado en FD2 no fue significativamente afectado ($P>0.10$) por ninguno de los factores analizados.

El porcentaje más alto para movimiento progresivo de los espermatozoides en semen sin diluir y diluido en FD2 según evaluado por CASA fue obtenido por el verraco mayor ($P\leq 0.10$, Tabla 6). Según Knecht et al. (2017b) el menor porcentaje de motilidad era mostrado por cerdos menores de un año y mayores de dos años. Se estima que los valores de porcentaje de movimiento progresivo se encuentren por debajo de porcentaje de motilidad, sin embargo, sigan la misma tendencia. Una posible explicación para esta diferencia en resultados puede estar asociada al bajo porcentaje de normalidad exhibido por el semen del verraco joven ($44.64\pm 6.03\%$), lo cual pudo

afectar su movimiento progresivo. Sin embargo, para el semen diluido en FD1, este efecto no fue observado.

El tiempo del día en que se colectó el verraco no tuvo un efecto ($P>0.10$) sobre el porcentaje de movimiento progresivo, ya fuera este en semen sin diluir o diluido en FD1 y FD2. La época de colección afectó el porcentaje de movimiento progresivo de espermatozoides para el semen sin diluir, siendo mayor durante la época fresca (44.01 ± 8.68 vs $28.07\pm 6.70\%$, $P=0.09$, época fresca vs caliente, respectivamente). Zasiadczyk et al. (2015) encontraron que el movimiento progresivo de los espermatozoides era significativamente mayor durante el periodo de otoño-invierno en comparación con el periodo de primavera-verano. Estos investigadores reportaron valores mayores a los encontrados en la presente investigación. Durante la época fresca (otoño-invierno) reportaron valores de alrededor de 60%, mientras que para la época caliente (primavera-verano) obtuvieron valores desde 40% hasta 60%. Cuando se evaluó este mismo efecto de época sobre el semen diluido (FD1 y FD2), el mismo no fue significativo ($P>0.10$) para la época ni sus respectivas interacciones.

Tabla 6. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para porcentaje de movimiento progresivo (%) de espermatozoides en semen evaluado por CASA para edad del verraco.

<i>Edad del Verraco</i>	<i>Movimiento progresivo (%)*</i>	
	5 años	2 años
Sin diluir	48.83 ± 4.34^a n=27	23.24 ± 12.42^b n=3
FD1	50.48 ± 4.67^a n=38	37.91 ± 5.15^a n=31
FD2	58.82 ± 6.55^a n=24	38.49 ± 6.12^b n=22

*LSM \pm error estándar, n = número de observaciones

^{a,b} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel $P\leq 0.10$

4. Volumen total de semen filtrado

El volumen total de semen filtrado fue significativamente afectado ($P=0.02$) por la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó, siendo el volumen total más alto para el verraco mayor cuando era colectado durante la época fresca (416.0 ± 15.3 mL). Otros investigadores (Knecht et al., 2017b; Fraser et al., 2016; Schulze et al., 2014; Wolf y Smital, 2009), han reportado resultados similares para verracos mayores colectados en diferentes épocas. Sin

embargo, este efecto no fue observado en el verraco joven, cuyo volumen total de semen filtrado no fue diferente ($P>0.10$) entre la época fresca o caliente. El verraco mayor mostró el volumen total más alto para ambas épocas (fresca o caliente) cuando se comparó con el verraco joven (Tabla 7). El tiempo del día en que se colectó ni sus respectivas interacciones afectaron ($P>0.10$) el volumen total de semen filtrado. Un volumen total más alto en el semen filtrado de verracos mayores, puede ser atribuido a un aumento en la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Fraser et al., 2016; Pinho, 2013, Knecht et al., 2013; Sonderman y Luebbe, 2008).

Tabla 7. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre el volumen total (mL) de semen filtrado.

	<i>Volumen total (mL)*</i>			
<i>Edad del Verraco</i>	5 años		2 años	
<i>Época del año</i>	Fresca	Caliente	Fresca	Caliente
Volumen total*	416.0±15.3 ^a n=22	344.5±14.6 ^b n=24	211.1±17.7 ^c n=17	215.3±16.2 ^c n=19

*LSM ± error estándar, n = número de observaciones

^{a,b} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel $P\leq 0.10$

5. Spermacue® vs CASA

Al comparar los dos métodos utilizados para medir la concentración en semen crudo (SpermaCue® y CASA), se encontró que los valores obtenidos en SpermaCue® fueron ($P\leq 0.0001$) mayores a los obtenidos por CASA (207.66 ± 7.48 vs $86.03\pm 21.04 \times 10^6/\text{mL}$). Esto no era de esperarse, ya que otros investigadores (Camus et al., 2011; Hansen et al., 2006) indican que no han encontrado diferencias significativas entre sistemas de CASA y fotómetros al evaluar el semen. Sin embargo, Camus et al. (2011) aclaran que puede haber muchos factores durante el procesamiento de semen que ocasionen pérdida de espermatozoides. Entre estos se encuentran: la transferencia a diferentes contenedores y la sedimentación. Estos factores pudieran contribuir a explicar la diferencia en los resultados obtenidos en la presente investigación ya que la evaluación con SpermaCue® se hizo en la finca justo luego de colectar el verraco y la muestra se tomó directamente del termo en que se colectó. Para la evaluación en CASA, ya el semen eyaculado y filtrado se había transferido a dos diferentes envases (el matraz calibrado donde se midió el volumen en la finca y la botella de inseminación donde se transportó el semen al laboratorio). En adición, tomaba casi una hora llegar desde la finca hasta el laboratorio, lo cual pudo haber causado sedimentación. Otro factor que se debe considerar fue la gran diferencia en el número de muestras

que se pudo evaluar para cada método. En SpermaCue[®] se evaluaron treinta y seis muestras para el verraco joven y cuarenta y cinco para el verraco mayor mientras que en CASA solo se pudieron evaluar tres muestras de semen crudo para el verraco joven y veintiocho para el verraco mayor. Esta limitación en el número de muestras evaluadas fue debida a la alta concentración en el semen del verraco joven, por lo cual, CASA no lo podía analizar.

B. Comportamiento sexual

El comportamiento sexual de los verracos expuestos a climas tropicales ha recibido poca atención comparado con la producción de semen. En la presente investigación, el comportamiento sexual fue evaluado considerando la duración en la actividad de monta de los verracos. Se evaluó el tiempo que tomaba desde que entraba al corral hasta que iniciaba la primera monta en el “dummy” (pre-monta), desde el inicio de la primera monta hasta que comenzaba la eyaculación (monta) y la duración de la eyaculación. Estos datos fueron estadísticamente transformados para poder ser analizados (Apéndice 9).

El efecto de la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre la actividad de monta se presenta en la Tabla 8. La duración de la pre-monta, fue mayor ($P=0.02$) para el verraco joven cuando era colectado en la época caliente (135.70 ± 62.14 segundos y 4.90 ± 0.15 para datos originales y transformados, respectivamente). Kunavongkrit et al. (2005) sugieren que durante la época caliente los cerdos reducen su consumo de proteína y según Louis et al. (1994) verracos con bajo consumo de proteína aumentan la duración de la pre-monta. Sin embargo, este efecto no fue observado en el verraco mayor, para el cual no se encontró diferencia significativa en la duración de pre-monta entre la época fresca y caliente. El verraco joven mostró la mayor duración de pre-monta independientemente de si era colectado en la época fresca o caliente cuando se comparó con el verraco mayor. Pinho et al. (2013) sugieren que periodos de pre-monta más largos en verracos es asociado a su inexperiencia, además indican que en su investigación, el 74.6% de los animales mostraron monta incorrecta, pero solo el 13.9% eran mayores, confirmando que el patrón de comportamiento sexual de los verracos que interactúan con el “dummy” es diferentes para verracos con experiencia sexual vs los menos experimentados (Levis y Reicks, 2005). La falta de experiencia sexual explicaría porque los verracos jóvenes obtienen una duración de pre-monta más larga, ya que ocurren muchas montas falsas antes de llegar a eyacular. En la presente investigación se podría considerar el verraco joven como inexperto

debido a que en muchas ocasiones hubo que ayudarlo para que se mantuviese sobre el “dummy” una vez comenzaba a montar y extender el pene.

Aunque la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó no fue significativa para la duración de la monta, los efectos principales si lo fueron. Sin embargo, la edad del verraco afectó la duración de la monta, siendo mayor para el verraco joven (4.99 ± 0.08 vs 4.58 ± 0.08 verraco joven vs verraco mayor, respectivamente, $P=0.001$). De igual forma, la duración de la monta fue más larga en la época fresca (4.90 ± 0.08 vs 4.65 ± 0.08 época fresca vs época caliente, respectivamente, $P=0.04$).

La edad del verraco x época del año afectó la duración de la eyaculación ($P=0.002$). El verraco mayor tuvo una duración de la eyaculación más larga, independientemente de la época en que fuera colectado (6.34 ± 0.09 y 6.33 ± 0.09 para época fresca y caliente, respectivamente, Tabla 8) cuando se comparó con el verraco joven durante la época fresca ($P=0.002$, Tabla 8). Estos resultados coinciden con lo encontrado por Pinho et al. (2013) quienes reportaron una duración de eyaculación significativamente menor en verracos jóvenes (0.8-2 años) con un promedio de 3.2 ± 0.8 minutos al compararlos con verracos mayores (2.1-6.4 años). En la presente investigación el verraco joven se tardó alrededor de 5 minutos en la fase de eyaculación durante la época fresca. Pinho et al. (2013) sugieren que una menor duración de la eyaculación en verracos jóvenes puede estar asociada a una menor producción de plasma seminal, menor volumen y, por lo tanto, un menor tiempo de colección, lo cual podría explicar los resultados obtenidos en la presente investigación. No se observaron diferencias significativas entre el verraco joven cuando era colectado en la época caliente y el verraco mayor, ya fuera este colectado en la época fresca o caliente.

El tiempo del día en que se colectó ni sus respectivas interacciones afectaron ($P>0.10$) la duración de ninguno de los parámetros que se utilizaron para evaluar comportamiento sexual.

Tabla 8. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para datos transformados y Media para datos originales (segundos) para la interacción edad del verraco x época del año en que se colectó sobre la actividad de monta de los verracos.

<i>Edad del verraco</i> <i>x</i> <i>Época del año</i>		<i>Duración</i>			
		5 años		2 años	
		Fresca	Caliente	Fresca	Caliente
Cuadrados Medios Esperados*	Pre-Monta	3.34±0.14 ^a n=22	3.40±0.14 ^a n=23	4.19±0.14 ^b n=22	4.90±0.15 ^c n=22
	Monta	4.64±0.11 ^a n=22	4.51±0.11 ^a n=23	5.18±0.11 ^a n=18	4.79±0.12 ^a n=19
	Eyaculación	6.34±0.09 ^a n=22	6.33±0.09 ^a n=23	5.58±0.09 ^b n=17	6.10±0.09 ^a n=19
Media** (segundos)	Pre-Monta	30.92±20.74 n=22	42.51±26.31 n=23	81.44±44.27 n=22	135.70±62.14 n=22
	Monta	120.73±56.69 n=22	94.70±59.43 n=23	220.90±121.66 n=18	135.20±54.01 n=19
	Eyaculación	637.51±217.32 n=22	553.84±129.07 n=23	304.37±131.74 n=17	436.26±90.28 n=19

*LSM ± error estándar, n = número de observaciones

**Media ± desviación estándar, n = número de observaciones

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel $P \leq 0.10$

C. Temperatura rectal

Cuando se evaluó la temperatura rectal de los verracos durante la colección como un indicador de estrés térmico, ninguna de las interacciones resultó estadísticamente significativa. Sin embargo, entre los factores principales que afectaron la temperatura rectal, se encuentra la edad del verraco, donde el verraco joven mostró la mayor temperatura rectal (36.74 ± 0.10 vs $36.44 \pm 0.09^\circ\text{C}$ para verraco joven vs verraco mayor, respectivamente, $P=0.03$, Tabla 9). Los valores de temperatura rectal encontrados para los verracos en la presente investigación, se encontraban por debajo de los valores promedio de temperatura rectal reportados por otros investigadores para cerdos jóvenes de 3-6 meses (40.3°C por Christon, 1988; 39.2°C por Huynh et al., 2006) y para verracos de 6 años (38.8°C por Wettermann et al., 1976) en ambientes tropicales donde la temperatura ambiental variaba entre 22.8 - 34.5°C . Las investigaciones encontradas sobre como la temperatura rectal varía entre las distintas edades son limitadas. Schulze et al. (2014) y Renaudeau et al. (2012) sugieren que los verracos jóvenes son menos susceptibles que los mayores a fluctuaciones en temperatura ambiental. Según estos investigadores esto es debido a su mejor

capacidad de termorregulación corporal lograda por una menor superficie corporal y menor cantidad de tejido subcutáneo. Lo opuesto fue encontrado en la presente investigación donde el verraco joven obtuvo la mayor temperatura rectal. Mas investigación es necesaria sobre las variaciones en temperatura rectal como efecto de la edad del verraco.

La temperatura rectal fue diferente para el tiempo del día en que se colectó el verraco, siendo mayor en las tardes ($37.04 \pm 0.10^\circ\text{C}$ vs $36.15 \pm 0.09^\circ\text{C}$ en la tarde vs la mañana, respectivamente, $P=0.07$). Huynh et al. (2006) reportaron fluctuaciones en la temperatura ambiental a través del día, siendo más alta en las tardes (32.6°C) y más baja en las mañanas (23.8°C). Debido a esto es de esperarse que las temperaturas rectales sean mayores durante la tarde. En la mayoría de las investigaciones revisadas, las medidas de temperatura rectal fueron hechas por la mañana y por la tarde, siendo los valores mayores durante la tarde (Huynh et al., 2006; Christon, 1988; Wettermann et al., 1976).

En adición, la época en que fueron colectados también afectó la temperatura rectal. Esta fue menor cuando los verracos fueron colectados en la época fresca ($36.47 \pm 0.10^\circ\text{C}$ vs $36.72 \pm 0.09^\circ\text{C}$, época fresca vs caliente, $P \leq 0.001$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por varios investigadores (Li et al., 2015; Huynh et al, 2006; Christon, 1988; Wettermann et al., 1976), quienes encontraron que la temperatura rectal aumentaba significativamente con un incremento en temperatura ambiental, siendo mayor en las tardes y época caliente. Los valores de temperatura rectal observados para las dos épocas en la presente investigación son más bajos que los reportados por Li et al. (2015), quienes reportaron temperaturas rectales de $38.43 \pm 0.06^\circ\text{C}$ en un ambiente fresco y de $39.45 \pm 0.08^\circ\text{C}$ en un ambiente expuesto a calor.

Tabla 9. Cuadrados Medios Esperados (LSM) para temperatura rectal ($^\circ\text{C}$) de verracos.

		Temperatura Rectal ($^\circ\text{C}$)*	Temperatura Mínima ($^\circ\text{C}$)	Temperatura Máxima ($^\circ\text{C}$)
<i>Edad de Verraco</i>	5 años	36.44 ± 0.09^a	35.28	38.56
	2 años	36.75 ± 0.10^b	34.44	38.28
<i>Tiempo</i>	AM	36.15 ± 0.09^a	35.28	37.00
	PM	37.04 ± 0.10^b	34.44	38.56
<i>Época</i>	Fresca	36.47 ± 0.10^a	34.44	38.56
	Caliente	36.72 ± 0.09^b	35.50	38.28

*LSM \pm error estándar, n = número de observaciones

^{a,b} Letras diferentes dentro de la misma línea indican diferencia significativa a nivel $P \leq 0.10$

D. Regresiones

El efecto de las covariables que resultaron estadísticamente significativas fue analizado para determinar el modelo de regresión que mejor se ajustaba. Cuando estas fueron analizadas, se observó una marcada diferencia entre los datos, asociada a la edad del verraco. Por esta razón, se decidió analizar los modelos de regresión separando los datos de cada verraco.

1. Calidad del Semen

a. Concentración del semen

En la presente investigación, la concentración del semen sin diluir (CONC) analizado en SpermaCue[®] fue influenciada ($P=0.05$) por la temperatura rectal (TR) cuando esta fue incluida como covariable en el modelo. La correlación entre ambas variables fue $r=0.32$ ($P=0.06$) para el verraco joven y $r=0.38$ ($P=0.01$) para el verraco mayor. El modelo que mejor se ajustó para el cerdo joven, fue el lineal con la siguiente ecuación: $CONC = -2480.1 + 76.591TR$ ($R^2=0.15$, $P=0.02$, Figura 1), mientras que $CONC = -510.57 + 15.945TR$ ($R^2=0.15$, $P=0.01$, Figura 2) fue la que mejor se ajustó para el verraco mayor. Por cada grado centígrado aumentado en temperatura rectal, se observaron aumentos de 76.591×10^6 y 15.945×10^6 espermatozoides/mL en los verracos joven y mayor, respectivamente. Esto contrasta con lo reportado por otros investigadores (Stone y Seamark, 1984; Stone, 1982; Cameron y Blackshaw, 1980; Wettemann et al., 1976; McNitt y First, 1970;) citados por Peña et al. (2017), quienes indican que verracos expuestos a estrés de calor (30°C a 40°C de temperatura ambiental) mostraban una disminución significativa en la concentración del semen. Stone (1981) citado por Peña (2017) reportó que el rango de temperatura de los testículos y los epidídimos tienden a ser 1.9 a 2.5°C menor que la temperatura rectal. Por lo tanto, a cualquier temperatura del aire, la temperatura rectal puede ser usada para estimar la temperatura del sistema escrotal (escroto, testículos y áreas adyacentes del cuerpo que pueden afectar directamente el balance térmico del testículo (McNitt et al., 1972)). Wettemann et al. (1976) reportaron temperaturas testiculares de hasta 39.2°C en cerdos expuestos a temperaturas ambientales de 34.5°C . Se esperaría que al aumentar la temperatura ambiental, se incremente la temperatura rectal, y por consiguiente ocurra un aumento en la temperatura escrotal conduciendo a una disminución en la espermatogénesis y en la concentración del semen.

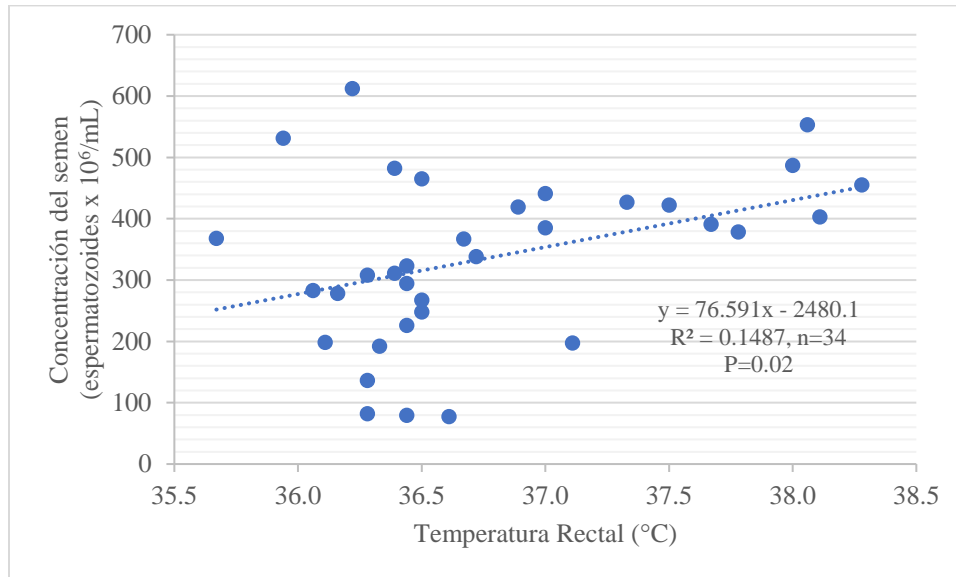


Figura 1. Relación entre la temperatura rectal y la concentración de semen según evaluado por SpermaCue® para el verraco joven.

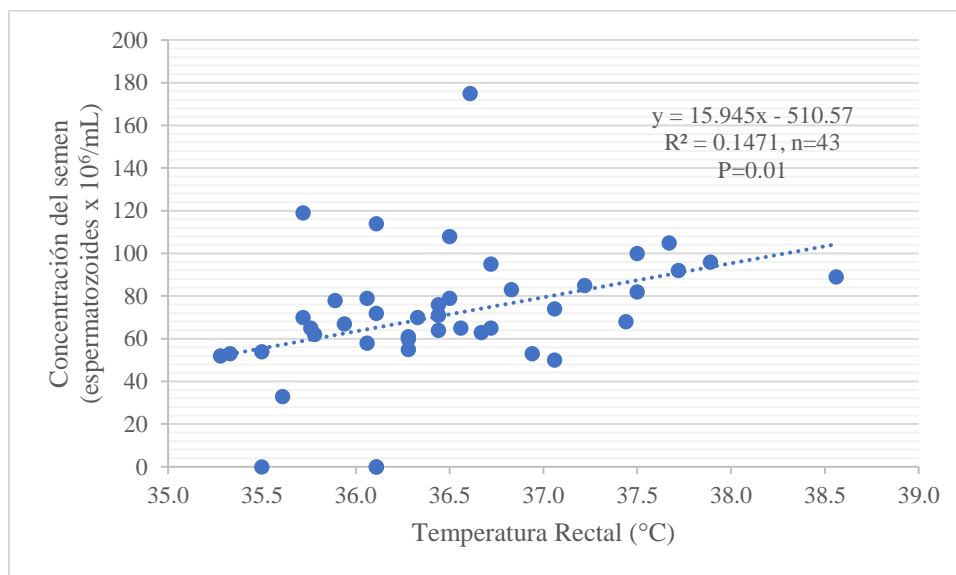


Figura 2. Relación entre la temperatura rectal y la concentración de semen según evaluado por SpermaCue® para el verraco mayor.

De igual forma, la temperatura rectal como covariable tuvo un efecto significativo sobre la concentración del semen sin diluir ($P=0.09$) y diluido en FD1 ($P=0.01$), según evaluados por CASA. Para el semen sin diluir evaluado por CASA, la correlación entre estas variables para el verraco mayor fue $r=0.59$ ($P<0.01$) con la siguiente ecuación: $CONC = -392.54 + 11.508TR$

($R^2=0.35$, $P=0.002$; Figura 3). Según la misma, por cada grado centígrado de aumento en la temperatura rectal del verraco mayor, la concentración del semen aumenta por 11.508×10^6 espermatozoides/mL. Sin embargo, para el verraco joven, ni la correlación entre ambas variables ($r=-0.58$, $P=0.61$) ni el modelo de regresión lineal ($P>0.10$) fueron significativos.

Para el semen del verraco joven diluido en FD1 se observó una asociación entre temperatura rectal y concentración del semen ($r=0.48$, $P<0.01$), resultando en la siguiente ecuación: $CONC = -10037 + 281.53TR$ ($R^2=0.31$, $P=0.002$; Figura 4). Esta indica que, por cada un grado Centígrado de aumento en la temperatura rectal del verraco joven, se espera que la concentración del semen aumente por 281.53×10^6 espermatozoides/mL. Sin embargo, para el verraco mayor, la correlación entre ambas variables ($r=0.26$, $P=0.13$), ni el modelo de regresión lineal ($P>0.10$) fueron significativos. Estos resultados contrastan con lo descrito por Knox (2003) citado por Peña et al. (2017), donde la producción de semen en verracos fue afectada negativamente por la exposición a estrés de calor. Según este investigador, debido a que los testículos en el verraco están más cercanos al cuerpo que en otros animales domésticos, se limita su capacidad de termorregulación. Por otra parte, la temperatura rectal como covariable no fue significativa ($P>0.1$) al analizar el semen diluido en FD2 según CASA para ninguno de los verracos.

A pesar de que los resultados obtenidos (Tabla 2 y 7) indicaban que el verraco mayor tenía el volumen más alto y la menor concentración, y que lo opuesto ocurría en el verraco joven independientemente de la época que se colectara, el volumen del semen como covariable no tuvo un efecto significativo ($P>0.1$) sobre la concentración del semen. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros investigadores quienes han observado una correlación negativa entre volumen del eyaculado y la concentración del semen (Knecht et al., 2017b).

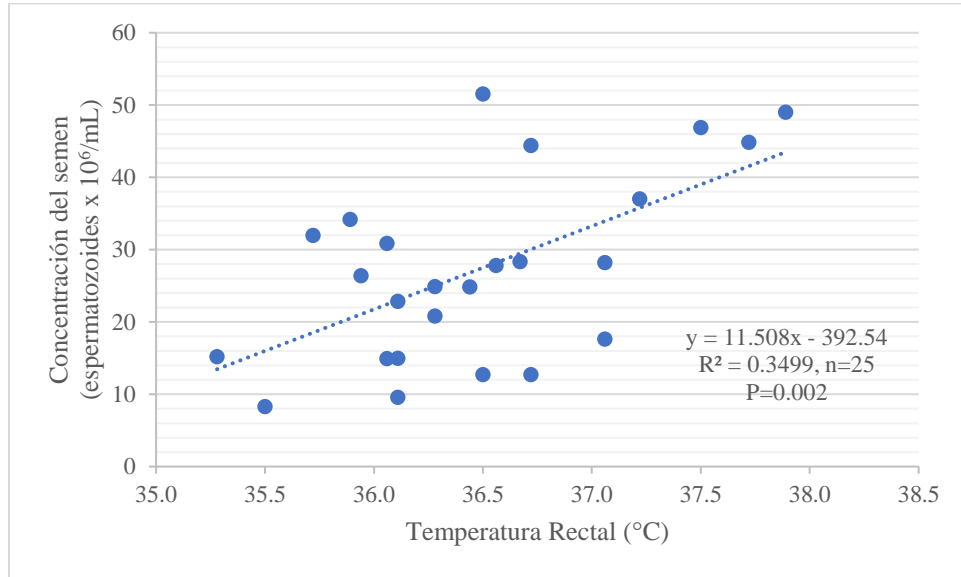


Figura 3. Relación entre la temperatura rectal y la concentración de semen sin diluir según evaluado por CASA para el verraco mayor.

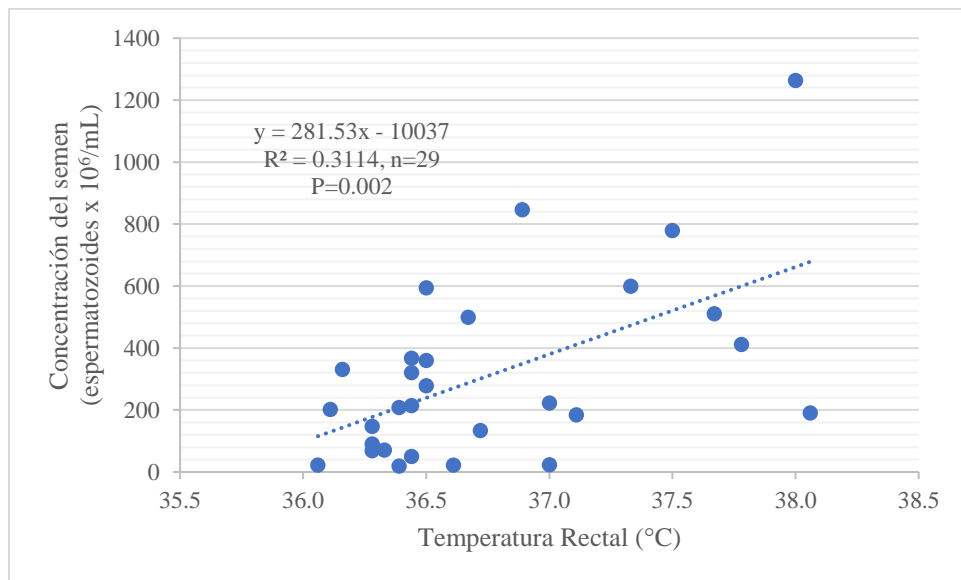


Figura 4. Relación entre la temperatura rectal y la concentración de semen diluido en FD1 evaluado por CASA para el verraco joven.

b. Total de espermatozoides en semen filtrado

El total de espermatozoides en el semen filtrado (TCONC) según evaluado por el SpermaCue[®] fue afectada por las covariables temperatura rectal (P=0.05) y volumen de semen

filtrado (VOL; $P < 0.001$). Para el verraco joven, el total de espermatozoides estuvo correlacionado con la temperatura rectal ($r = 0.41$, $P = 0.02$) y con el volumen de semen filtrado ($r = 0.67$, $P < 0.01$). El modelo que mejor se ajustó fue $TCONC = -497679 + 13162TR + 392.09VOL$ ($R^2 = 0.51$, $P < 0.0001$). Según la misma, se estima que al aumentar la temperatura rectal por un grado centígrado, se espera que el total de espermatozoide aumente por $13,162 \times 10^6$ espermatozoides cuando el volumen de semen filtrado es constante. De igual manera, utilizando la misma ecuación se puede estimar que cuando la temperatura rectal es constante y se aumenta el volumen de semen filtrado por un mililitro, el total de espermatozoides aumentará por 392.09×10^6 espermatozoides. Para el verraco mayor, el total de espermatozoides estuvo correlacionado con la temperatura rectal ($r = 0.41$, $P < 0.01$) y con el volumen de semen filtrado ($r = 0.34$, $P = 0.02$). La relación se describe con la siguiente ecuación: $TCONC = -199622 + 5772TR + 40.14VOL$ ($R^2 = 0.26$, $P = 0.003$). Esta estima que ocurrirá un aumento de $5,772 \times 10^6$ espermatozoides cuando aumenta la temperatura rectal por un centígrado y el volumen del semen filtrado se mantiene constante. Esto contrasta con lo obtenido por Li et al. (2015) quienes encontraron que altas temperaturas ambientales provocan un aumento en la temperatura rectal y escrotal, alterando la espermatogénesis y causando una reducción en el número total de espermatozoides. De igual forma, la ecuación puede estimar que al aumentar el volumen de semen filtrado por un mililitro, el total de espermatozoides en el eyaculado aumentará por 40.14×10^6 espermatozoides, mientras la temperatura rectal sea constante. Esto concuerda con las observaciones de Knecht et al. (2017b) donde hubo una correlación positiva entre volumen del eyaculado y número total de espermatozoides ($r = 0.503$).

Al evaluar el efecto del volumen de semen filtrado en semen sin diluir y diluido en FD1 por CASA sobre el total de espermatozoides, este no fue significativo para los verracos evaluados ($P > 0.10$). Sin embargo, la temperatura rectal como covariable sí tuvo un efecto sobre el total de espermatozoides en semen sin diluir ($P = 0.1$) y semen diluido en FD1 ($P = 0.03$) evaluados por el CASA. Para el semen sin diluir del verraco mayor evaluado por CASA, la correlación entre dichas variables fue $r = 0.56$ ($P < 0.01$). El modelo de regresión que mejor se ajustó fue el lineal, con la ecuación: $TCONC = -134637 + 3952.4TR$ ($R^2 = 0.31$, $P = 0.004$; Figura 5). Con la misma se puede estimar que por cada grado centígrado de aumento en la temperatura rectal del verraco mayor, ocurrirá un aumento de 3952.4×10^6 espermatozoides totales en el semen filtrado. Por su parte, ni la correlación entre total de espermatozoides de semen sin diluir evaluado por CASA y temperatura rectal para el verraco joven ($r = -0.29$, $P = 0.81$), ni los modelos de regresión ($P > 0.10$) fueron

significativos. La presente investigación contrasta con algunos investigadores, quienes indican que el exponer los verracos a elevadas temperaturas ambientales provoca estrés de calor (Ogbu et al., 2014) debido a su baja capacidad para disipar calor. Esto resulta en un aumento en la temperatura corporal (Misztal, 2017), causando problemas en la producción de espermatozoides (Mawyer et al., 2012; Sonderman y Luebbe, 2008) y provocando una reducción en la cantidad total de espermatozoides en el eyaculado (Frydrychova et al., 2007, citados por Ogbu et al., 2014; Kunavongkrit et al., 2005).

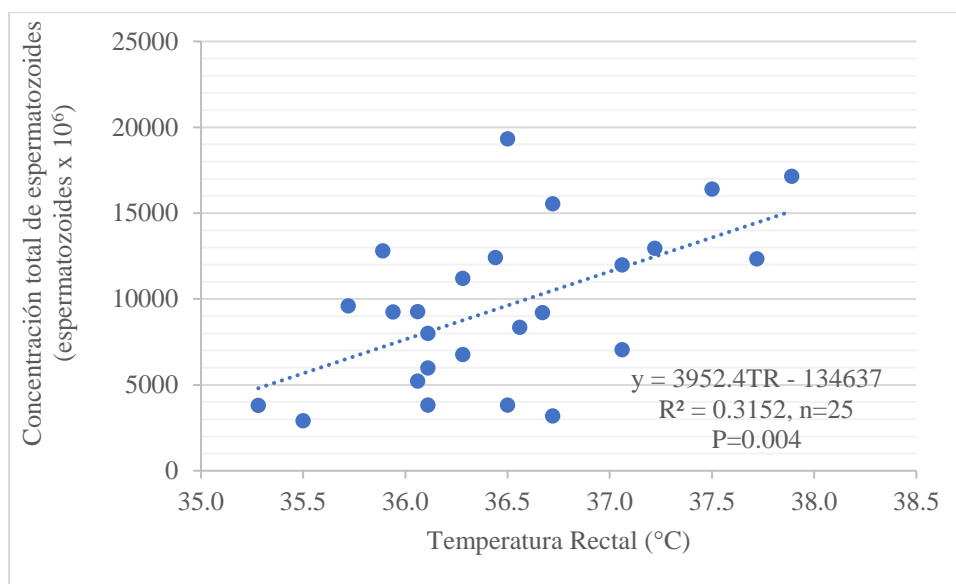


Figura 5. Relación entre la temperatura rectal y el total de espermatozoides en semen sin diluir evaluada por CASA para el verraco mayor.

Para el semen diluido en FD1 del verraco joven, la correlación con temperatura rectal fue $r=0.48$ ($P<0.01$), descrito por la siguiente ecuación: $TCONC = -1E+06 + 37162TR$ ($R^2=0.23$, $P=0.007$; Figura 6). Para el total de espermatozoides del semen diluido en FD1 del verraco mayor, ni la correlación con temperatura rectal ($r=0.22$, $P=0.20$) ni los modelos de regresión ($P>0.10$) fueron significativos. La temperatura rectal como covariable no tuvo efecto ($P>0.10$) para el semen diluido en FD2 analizado en CASA. Según resultados anteriores (Tabla 4 y 7) se hubiese esperado que fuera significativo, sin embargo, en la presente investigación, el volumen como covariable no afectó significativamente la mayoría de las variables antes mencionadas.

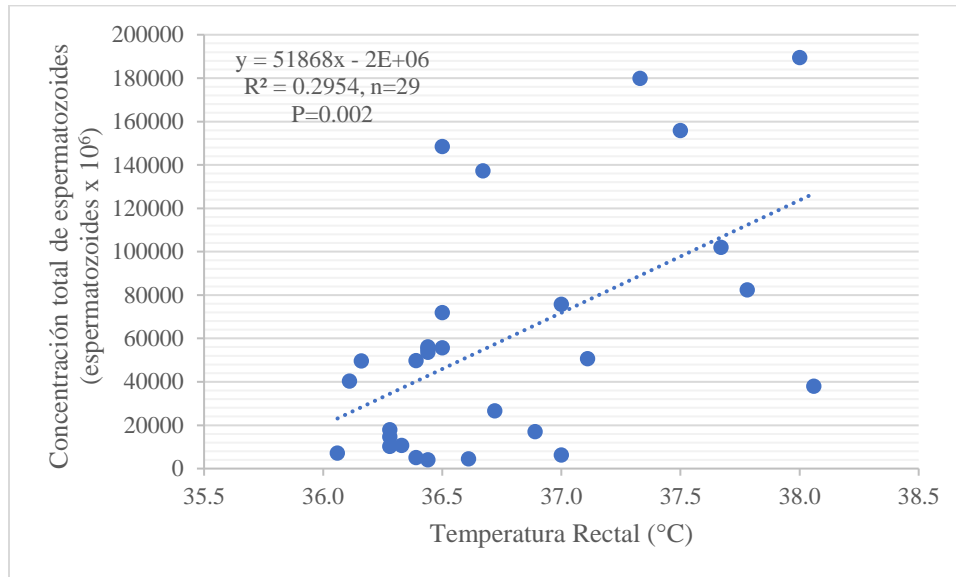


Figura 6. Relación entre la temperatura rectal y el total de espermatozoides en semen diluido en FD1 evaluada por CASA para el verraco joven.

c. Porcentaje de movimiento progresivo de espermatozoides evaluados por CASA

El porcentaje de movimiento progresivo de los espermatozoides (MOVP) en semen sin diluir según evaluado por CASA fue significativamente afectado ($P=0.03$) por la temperatura rectal cuando esta se incluyó como covariable en el modelo. La correlación entre las variables para el verraco mayor fue $r=0.53$ ($P<0.01$). El modelo de regresión que mejor se ajustó fue: $MOVP = -452.56 + 13.624TR$ ($R^2=0.28$, $P=0.008$; Figura 8). Esta describe que, al aumentar la temperatura rectal del verraco mayor por un grado centígrado se espera que el porcentaje de movimiento progresivo aumente por 13.62%. Por otra parte, para el verraco joven, ni la correlación entre porcentaje de movimiento progresivo y temperatura rectal ($r=-0.13$, $P=0.92$), ni el modelo de regresión fueron significativos. Esto contrasta con lo reportado por varios investigadores (Li et al., 2015; Ogbu et al., 2014; Suriyasomboon et al., 2004; Wettermann et al., 1979; McNitt et al., 1972), quienes indican que exponer los verracos a elevadas temperaturas ambientales provoca una interrupción en los mecanismos de termorregulación como respuesta a hipertermia (estrés de calor) donde la temperatura testicular (estimada por la temperatura rectal) aumenta, alejándose de la temperatura óptima para la espermatogénesis y causando una disminución en la motilidad de los espermatozoides. Sin embargo, la temperatura rectal como covariable no tuvo efecto ($P>0.1$) al

analizar el semen diluido en FD1 y 2 en CASA. El volumen como covariable no tuvo un efecto significativo para las variables antes mencionadas.

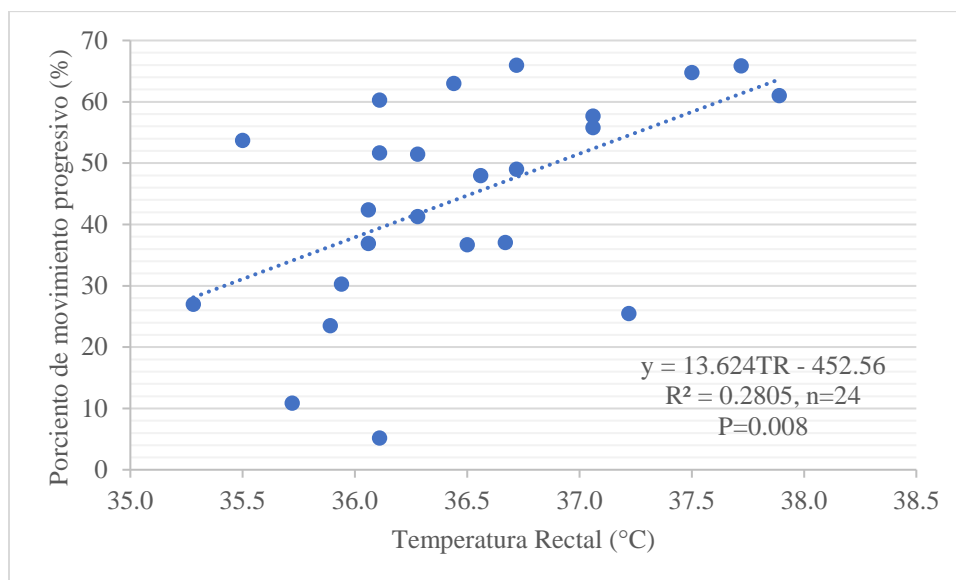


Figura 7. Relación entre la temperatura rectal y el porcentaje de movimiento progresivo en semen sin diluir evaluado por CASA para el verraco mayor.

d. Volumen total de semen filtrado

El volumen total de semen filtrado fue afectado ($P=0.09$) por la temperatura rectal cuando esta se incluyó en el modelo como covariable. Sin embargo, no se observaron correlaciones entre estas variables con $r=0.25$ ($P=0.15$) y $r=0.06$ ($P=0.72$), para los verracos joven y mayor, respectivamente. Asimismo, cuando se analizaron los distintos modelos de regresión, ninguno fue significativo ($P>0.10$).

e. Efecto de la temperatura rectal sobre concentración del semen, concentración total de espermatozoides y porcentaje de movimiento progresivo

Los resultados obtenidos en la presente investigación para describir la relación entre la temperatura rectal como indicador de estrés calórico y la concentración de semen, total de espermatozoides y porcentaje de movimiento progresivo, fue contrario a lo reportado por otros investigadores, quienes han encontrado que el estrés de calor interrumpe el proceso de espermatogénesis causando una reducción en producción de semen y motilidad de espermatozoides (Knecht et al., 2017b; Wang et al., 2017; Li et al., 2015; Peña et al., 2015; Ogbu

et al., 2014; Mawyer et al., 2012; Tretipskul et al., 2012; Lin et al., 2006; Suriyasomboon et al., 2004; Wettermann et al., 1976). Una posible explicación debe incluir un efecto adaptativo al estrés de calor por parte de los cerdos usados en esta investigación, los cuales nacieron y se criaron bajo condiciones de clima tropical. Varios investigadores han encontrado que verracos criados y mantenidos bajo ambientes tropicales y subtropicales por generaciones, que se enfrentan a altas temperaturas de forma crónica, pueden adaptarse y mejoran su tolerancia a estrés de calor como una repuesta termorreguladora a largo plazo (Renaudeau et al., 2012; Renaudeau et al., 2007; Renaudeau, 2005; Egbunike y Dede, 1980). Cameron y Blackshaw (1980) y Renaudeau et al. (2006) reportaron que verracos expuestos a temperaturas ambientales entre 28 y 37.7°C y una humedad relativa entre 40 y 80% sufrían estrés de calor cuando la temperatura rectal se acercaba a 40°C, pero aparentaban adaptarse a una prolongada exposición ya que al pasar el tiempo, comenzaba a disminuir su temperatura rectal.

Según Sonderman y Luebbe (2008) temperaturas ambientales sobre los 29°C, con una humedad relativa de 85% afecta la espermatogénesis. En la presente investigación, según se puede observar en el Apéndice 3, el promedio de temperatura máxima excedió los 30°C durante todos los meses del año que duró la investigación. Sin embargo, el promedio de temperatura promedio, no alcanzó los 28°C, ni siquiera en los meses considerados calientes. Es posible que la temperatura del aire no alcanzara la temperatura crítica superior, (30 a 32°C; marca el comienzo para un aumento en la temperatura rectal de los cerdos), el tiempo suficiente para provocar estrés de calor en los animales (Renaudeau, 2005).

Asimismo en la presente investigación, la temperatura rectal más alta medida en los verracos fue de 38.56°C (temperatura rectal promedio más alta fue de 37.04±0.10°C), con lo cual aparentan no haber estado sufriendo de estrés de calor severo, a pesar de estar expuestos a un promedio de temperatura del aire de hasta 29.81°C (Apéndices 5 y 6) y una humedad relativa promedio de hasta 81.40% (Apéndices 7 y 8) dentro del corral de colección. Es posible que al analizar las ecuaciones de regresión, con los datos de temperatura rectal obtenidos, todavía no se haya alcanzado el efecto de estrés calórico sobre la calidad del semen, reportado por otros investigadores.

2. Comportamiento sexual

a. Duración de monta

El comportamiento sexual medido por la duración de monta (MONTA) fue afectado por la temperatura del aire (TA; $P=0.10$) y humedad relativa (HR; $P=0.07$) dentro del corral. Sin embargo, para el verraco joven, no se observó una asociación entre la duración de monta con la temperatura ($r=-0.27$, $P=0.12$) ni con la humedad relativa ($r=0.04$, $P=0.81$) dentro del corral. A pesar de esto, se observó la siguiente relación cuadrática: $MONTA=14.01 - 0.0667TA - 0.1933HR + 0.0013HR^2$ ($R^2=0.21$, $P=0.07$). Según la misma, se estima que al aumentar la temperatura del aire dentro del corral por un grado centígrado, se espera que la duración de la monta se reduzca por 0.0667 cuando la humedad relativa es constante. Utilizando la misma ecuación se puede estimar que cuando la temperatura del aire del corral es constante, a medida que aumenta la humedad relativa se disminuirá la duración de monta y luego ocurrirá un aumento. Para el verraco mayor, no hubo correlación de la duración de la monta con la temperatura del aire ($r=-0.21$, $P=0.20$) ni con la humedad relativa ($r=-0.12$, $P=0.45$) dentro del corral. Sin embargo, el siguiente modelo de regresión resultó significativo: $MONTA = 2.4197 - 0.0948TA - 0.1726HR + 0.0014HR^2$ ($R^2=0.36$, $P=0.001$), el cual estima que al aumentar la temperatura del aire dentro del corral por un grado centígrado, se espera que la duración de monta se disminuya por 0.0948 cuando la humedad relativa es constante. Utilizando la misma ecuación se puede estimar que cuando la temperatura del aire del corral es constante, a medida que aumenta la humedad relativa se disminuirá y luego habrá un aumento en la duración de monta. Aumentar la temperatura del aire causa estrés de calor en verracos criados en áreas del trópico (Rosé et al., 2017). Estos efectos adversos pueden ser acentuados por una alta humedad relativa (Huynh et al, 2005 citado por Rosé et al., 2017 y West, 2003 citado por Misztal, 2017). El estrés de calor puede llevar a adaptaciones de comportamiento en nuestros animales (Renaudeau et al, 2012) como reducción en el movimiento voluntario (Qu et al., 2016) y libido (Ogby et al., 2014). Los datos obtenidos en la presente investigación podrían concordar con los investigadores antes mencionados en que aumentar la temperatura del aire disminuirá la duración de monta debido a la reducción de libido causada por estrés de calor, pero no concuerda con que a mayor humedad relativa, los efectos sean acentuados y por ende peores. Una posible explicación puede ser el que los cerdos de climas tropicales y subtropicales, donde la temperatura tiende a ser elevada y es acompañada por un alto por ciento de humedad relativa, se hayan aclimatizado (Renaudeau et al., 2012), pero poco se

conoce sobre el comportamiento sexual de los cerdos en estos climas y cómo estos se vean afectados por la temperatura del aire y la humedad relativa.

b. Duración de eyaculación

De las covariables incluidas en el modelo, solamente temperatura del aire dentro del corral afectó ($P=0.06$) el comportamiento sexual medido por la duración de la eyaculación. Sin embargo, no se observó correlación entre estas variables ($r=-0.08$ ($P=0.67$) y $r=-0.21$ ($P=0.20$), para el verraco joven y el mayor, respectivamente). Cuando se corrieron los distintos posibles modelos de regresión, ninguno resultó significativo.

VI. Conclusión

Al evaluar el efecto de la edad del verraco, tiempo del día en que se colectaba y época del año sobre la calidad del semen y el comportamiento sexual de verracos criados en un ambiente tropical, se encontró que la mayor concentración de semen y concentración total de espermatozoides la obtuvo el verraco joven cuando era colectado en las tardes y durante la época fresca. También se encontró que la concentración total de espermatozoides varió entre los métodos de evaluación de semen. El porcentaje de normalidad fue superior en el verraco mayor para el semen diluido en FD1 cuando era colectado en las tardes; así como para el semen sin diluir. El mayor porcentaje de movimiento progresivo fue observado en el semen del verraco mayor y en el semen colectado durante la época fresca. El volumen de semen filtrado fue significativamente ($P < 0.10$) superior para el verraco mayor colectado durante la época fresca. La pre-monta fue más larga para el verraco joven durante la época caliente, mientras que la eyaculación fue más corta para el verraco joven durante la época fresca. Mientras tanto, la duración de monta fue más larga para el verraco joven y cuando eran colectados en la época fresca. Se encontró que la edad del verraco, tiempo del día y época del año afectaron la temperatura rectal de los verracos durante la colección, siendo mayor para el verraco joven, cuando eran colectados en las tardes y durante la época caliente. De los análisis de regresión se pudo determinar que la concentración de semen, concentración total de espermatozoides y el porcentaje de movimiento progresivo, fueron afectados por la temperatura rectal y volumen de semen filtrado. La duración de monta fue afectada por la temperatura del aire y la humedad relativa dentro del corral. Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que la calidad del semen y el comportamiento sexual en verracos son influenciados por la edad, el tiempo del día y la época en que son colectados y que los valores obtenidos no necesariamente coinciden con lo reportado para verracos mantenidos en climas templados.

VII. Recomendaciones

El efecto de la temperatura ambiental y la edad del verraco sobre la calidad de semen y comportamiento sexual necesita más investigación en regiones tropicales. Algunos puntos que se puede trabajar son:

- 1- Utilizar verracos de varios rangos de edades (8 meses a 3 años).
- 2- Utilizar mayor cantidad de verracos.
- 3- Extender el periodo de investigación a 3 o más años.

VIII. Referencias bibliográficas

- Amann R. y D. Waberski. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81: 5-17.
- Blainey, C. (1974). Site Selection in Taking Body Temperature. *The American Journal of Nursing*. 74(10): 1859-1861.
- Brokhuijse M.L.W.J., E. Šoštarić, H. Feitsma y B.M. Gadella. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*. 76: 1473-1486.
- Cameron, R.D.A. y A.W. Blackshaw. 1980. The effect of elevated ambient temperature on spermatogenesis in the boar. *J. Reprod. Fert.* 59: 173-179.
- Camus, A., S. Camugli, C. Lévêque, E. Schmitt y C. Staub. 2011. Is photometry an accurate and reliable method to assess boar semen concentration? *Theriogenology*. 75: 577-583.
- Ciereszko, A., J.S. Ottobre y J. Glogowski. 2000. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Animal Reproduction Science*. 64: 89-96.
- Christon, R. 1988. The effect of tropical ambient temperature on growth and metabolism in pigs. *J. Anim. Sci.* 66: 3112-3123.
- Dong, H.J., D. Wu, S.Y. Xu, Q. Li, Z.F. Fang, L.Q. Che, C.M. Wu, X.Y. Xu y Y. Lin. 2016. Effect of dietary supplementation with amino acids on boar sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science*. 172: 182-189.
- Egbunike, G.N. y T.I. Dede. 1980. The influence of short-term exposure to tropical sunlight on boar seminal characteristics. *Int. J. Biometeor.* 24(2): 129-135.
- Estienne, M. 2014. A review of the effect of prostaglandins on sexual behavior in boars. *Applied Animal Behaviour Science*. 154: 1-7.
- Flowers W.L. 2008. Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars. *Theriogenology*. 70: 1297-1303.
- Frangež, R., T. Gider y M. Kosec. 2005. Frequency of Boar Ejaculate Collection and its Influence on Semen Quality, Pregnancy Rate and Litter Size. *ACTA VET BRNO*. 74: 265-273.
- Fraser, L., J. Strzeżek, K. Filipowicz y M. Mogielnicka-Brzozowska. 2016. Age and seasonal-dependent variations in the biochemical composition of boar semen. *Theriogenology*. 86: 806-816.
- González-Peña, D., R.V. Knox y S.L. Rodríguez-Zas. 2016. Contribution of semen trait selection, artificial insemination technique, and semen dose to the profitability of pig production systems: A simulation study. *Theriogenology*. 85: 335-344.
- Hamilton Thorne Inc. 2014. HT CASA II Software Manual. Beverly, MA.
- Hansen, C., T. Vermeiden, J.P.W. Vermeiden, C. Simmet, B.C. Day y H. Feitsma. 2006. Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254

- photometer, Sperm Vision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology*. 66: 2188-2194.
- Huynh, T.T.T., A.J.A. Aarnink, C.T. Rroung, B Kemp y M.W.A. Verstegen. 2006. Effects of tropical climate and water cooling methods on growing pigs' responses. *Livestock Science*. 104: 278-291.
- Jacyno, E., M. Kawęcka, A. Pietruszka y A. Sosnowsha. (2015). Phenotypic Correlations of Testis Size with semen traits and productive traits of young boars. *Reprod Dom Anim*. 50: 926-930.
- Jiménez, E. 2015. Notas del curso INPE5055 Biotecnología Animal. Departamento de Ciencia Animal. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.
- Knecht D., A. Jankowska-Mąkosza y K. Duziński. 2017a. Boar genotype as a factor shaping age-related changes in semen parameters and reproduction longevity simulations. *Theriogenology*. 98:50-56.
- Knecht D., A. Jankowska-Mąkosza y K. Duziński. 2017b. The effect of age, interval collection and season on selected semen parameters and prediction of AI boars productivity. *Livestock Science*. 201: 13-21.
- Knecht D., S. Środoń, K. Sulc y K. Duziński. 2013. The effect of photoperiod on selected parameters of boar semen. *Livestock Science*. 157: 364-371.
- Knox, R.V. 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*. 85: 83-93.
- Kozink, D.M., M.J. Estienne, A.F. Harper y J.W. Knight. 2004. Effects of dietary L-carnitine supplementation on semen characteristics in boars. *Theriogenology*. 61: 1247-1258.
- Kumar N., R.P. Verma, L.P. Singh, V.P. Varshney y R.S. Dass. 2006. Effect of different levels and surces of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus x Bos Taurus*) bulls. *Reprod. Nutr. Dev*. 46: 663-675.
- Kumaresan, A., K.M. Bujarbaruah, G. Kadirvel, G. Khargharia, R, Sarma, J. Goswami, R. Basumatary, K. Palaniappan y R.K. Bardoloi. 2011. Early sexual maturity in local boars of Northeastern India: Age-related changes in testicular growth, epididymal sperm characteristics and peripheral testosterone levels. *Theriogenology*. 75: 687-695.
- Kunavongkrit A., A. Suriyasomboon, N. Lundeheim, T.W. Hearda y S. Einarsson. 2005. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. *Theriogenology*. 63(2): 657-667.
- Lammers, P., D. Stender y M. Honeyman. 2007. Environmental needs of the pig. *Niche Pork Production*. 210: 1-6.
- Levis, D.G. y D.L. Reicks. 2005. Assessment of sexual behavior and effect of semen collection pen design and sexual stimulation of boars on behavior and sperm output-a review. *Theriogenology*. 63: 630-642.
- Li, Y., A. Wang, K. Taya y C. Li. (2015). Declining semen quality and steadying seminal plasma ions in heat-stressed boar model. *Reprod Med Biol*. 14: 171-177.

- Lin, C., E. Tholen, D. Jennen, S. Ponsuksili, K. Schellander y K. Wimmers. 2006. Evidence for effect of testis and epididymis expressed genes on sperm quality and boar fertility trait. *Reprod Dom Anim.* 41, 538-543.
- Louis, G.F., A.J. Lewis, W.C. Weldon, P.S. Miller, R.J. Kittok y W.W. Stroup. 1994. The effect of protein intake on boar libido, semen characteristics and plasma hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 72: 2038-2050.
- Macchiavelli, R. 2017. Notas del curso AGRO6005 "Use of Statistical Software in Biometry". Departamento de Ciencias Agroambientales. Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez.
- Mawyer, J.D., C.A. Cavinder, M.M. Vogelsang, D.H. Sigler, C.C. Love, S.P. Bringsko, T.L. Blanchard, D.D. Varner, C.E. Arnold, S. Teague y R.L. Gordon. 2012. Thermoregulation of the testicle in response to exercise and subsequent effects on semen characteristics of stallions. *J. Anim. Sci.* 90: 2532-2539.
- McNitt, J.I., C.B. Tanner y N.L. First. 1972. Thermoregulation in the scrotal system of the boar. *Journal of Animal Science.* 34(1): 112-116.
- Misztal, I. 2017. Breeding and genetics symposium: Resilience and lessons from studies in genetics of heat stress. *J. Anim. Sci.* 95: 1780-1787.
- Nardone, A., B. Ronchi, N. Lacetera, M.S. Ranieri y U. Bernabucci. 2010. Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livestock Science.* 130: 57-69.
- NRC. 1998. National Research Council. Nutrient Requirements of Swine. Tenth Revised Edition. National Academic Press, Washington, D.C. 20418 USA.
- Ogbu, C., F. Elile, N. Machebe y S. Ugwu. 2013. Body temperature and haematological indices of boars exposed to direct solar radiation. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare.* 7 (3):72-80.
- Ogbu, C.C., F.C. Elile, S.O.C. Ugwu y N.S. Machebe. 2014. Libido and ejaculate characteristics of boars exposed to direct solar radiation. *The Journal of Animal & Plant Sciences.* 24(1): 43-49.
- Peña Jr., S.T., B. Gummow, A.J. Parker y D.B.B.P. Paris. 2017. Revisiting summer infertility in the pig: could heat stress-induce sperm DNA damage negatively affect early embryo development? *Animal Production Science.* 57: 1975-1983.
- Philippe, F.-X. y B. Nicks. 2015. Review on greenhouse gas emissions from pig houses: Production of carbon dioxide, methane and nitrous oxide by animals and manure. *Agriculture, Ecosystems and Environment.* 199: 10-25.
- Pinho R.O., H.H. Shiomi, D.M.A. Lima, E.V. Costa, A.Y. Chaya, P.S. Lopes, S.E.F. Guimarães y J.D. Guimarães. 2013. Sexual behavior and seminal quality of Piau boars. *Journal of Veterinary Behavior.* 8: 357-361.
- Prince, E. 1985. Sexual behavior of large domestic farm animals: an overview. *Journal of Animal Science.* 61: 62-74.

- Pruneda, A., E. Pinart, M. Briz, S. Sancho, N. Garcua-Gil, E. Badia, E. Kádár, J. Bassols, E. Bassalleu, M. Yeste y S. Bonet. 2005. Effects of a high semen collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal region in boars. *Theriogenology*. 63: 2219-2232.
- Qu, H., H. Yan, H. Lu, S.S. Donkin y K.M. Ajuwon. 2016. Heat stress in pig is accompanied by adipose tissue-specific responses that favor increase triglyceride storage. *J. Animal. Sci.* 94(5): 1884-1896.
- Renaudeau, D. 2005. Effects of short-term exposure to high ambient temperature and relative humidity on thermoregulatory responses of European (Large White) and Caribbean (Creole) restrictively-fed growing pigs. *Anim. Res.* 54:81-93.
- Renaudeau, D., E. Huc, M. Kerdoncuff y J.L. Noblet. 2006. Acclimation to high ambient temperature in growing pigs: effects of breed and temperature level. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.), November 7-10.
- Renaudeau, D., E. Huc y J. Noblet. 2007. Acclimation to high ambient temperature in Large White and Caribbean Creole growing pigs. *J. Anim. Sci.* 85: 779-790.
- Renaudeau, D., A. Collin, S. Yahav, V. de Basilio, J.L. Gourdine y R.J. Collier. 2012. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. *Animal*. 6(5): 707-728.
- Robinson, J.J. 1990. Nutrition in the reproduction of farm animals. *Nutrition Research Reviews*. 3: 253-276.
- Rohrer, G.A., T. Brown-Brandl, L.A. Rempel, J.F. Schneider y J.Holl. 2013. *Livestock Science*. 157: 28-37.
- Rosé, R., H. Gilbert, T. Loyau, M. Giorgi, Y. Billon, J. Riquet, D. Renaudeau y J.-L. Gourdine. 2017. Interactions between sire family and production environment (temperate vs. tropical) on performance and thermoregulation responses in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 95: 4738-4751.
- SAS Institute Inc. 2014. SAS/STAT® 9.4 User's Guide. Cary, NC.
- Schulze, M., H. Henning, K. Rüdiger, U. Wallner y D. Waberski. 2013. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology* 80: 990-998.
- Schulze, M., S. Buder, K. Rüdiger, M. Beyarvach y D. Waberski. 2014. Influences on semen traits used for selection of young AI boars. *Animal Reproduction Science*. 148: 164-170.
- SERCC. 2007. The Southeast Regional Climate Center. Encontrado en: <https://www.sercc.com/cgi-bin/sercc/cliMAIN.pl?pr5097>.
- Shinde, K.P. y S.K. Gupta. 2016. Scientific artificial insemination in swine. *Asian J. Animal Sci.* 11(1): 60-64.
- Shipley, CF. 1999. Breeding soundness examination of the boar. *Swine Health Prod.* 7(3): 117-120.

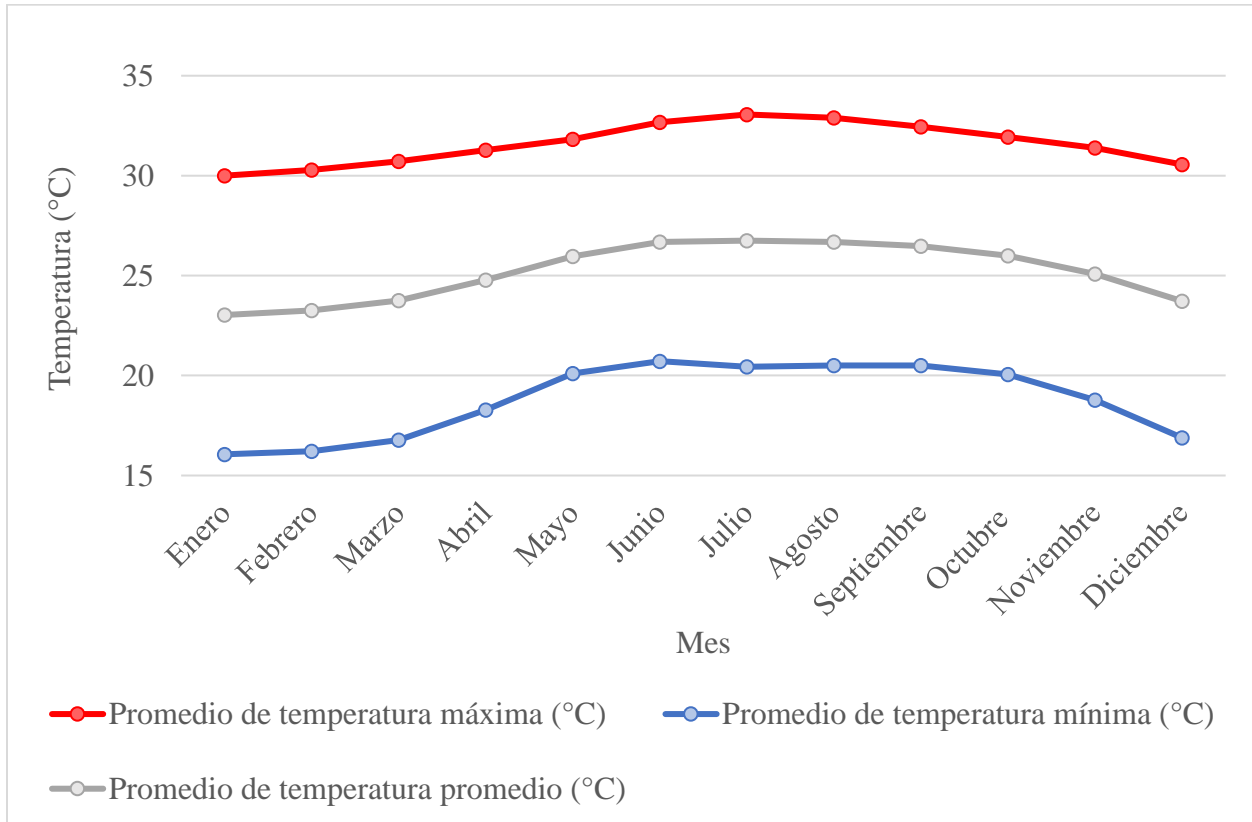
- Smital J. 2009. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*. 110: 335-346.
- Smital, J., L.L. De Sousa y A. Mohsen. 2004. Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boars sperm output. *Animal Reproduction Science*. 80: 121-130.
- Sonderman J.P. y J.J. Luebbe. 2008. Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars. *Theriogenology*. 70: 1380-1383.
- Suriyasomboon A., N. Lundeheim, A. Kunavongkrit y S. Einarsson. 2004. Effect of temperature and humidity on sperm production in Duroc boars under different housing systems in Thailand. *Livestock Production Science*. 89: 19-31.
- Tretipskul, C., N. Am-in, P. Tummaruk y M. Techakumphu. 2012. Season and breed effect on sperm production in PRRS free boars. *Thai J Vet Med*. 42(4): 471-476.
- Wang, C., J.L. Li, H.K. Wei, Y.F. Zhou, J.J. Tan, H.Q. Sun, S.W. Jiang y J. Peng. 2016. Effects of feeding regimen on weight gain, semen characteristics, libido, and lameness in 170- to 250-kilogram Duroc boars. *J. Anim. Sci*. 94: 4666-4676.
- Wang, C., J.L. Li, H.K. Wei, Y.F. Zhou, J.J. Tan, H.Q. Sun, S.W. Jiang y J. Peng. 2017. Linear growth model analysis of factors affecting boar semen characteristics in Southern China. *J. Anim. Sci*. 95: 5339-5346.
- Wettermann, R.P., M.E. Wells, I.T. Omtvedt, C.E. Pope y E.J. Turman. 1976. Influence of elevated ambient temperature on reproductive performance of boars. *Journal of Animal Science*. 42(3): 664-669.
- Wettermann, R.P., M.E. Wells y R.K. Johnson. 1979. Reproductive characteristics of boars during and after exposure to increased ambient temperature. *Journal of Animal Science*. 49(6): 1501-1505.
- Wilson, M., K. Rozeboom y T. Crenshaw. 2004. Boar nutrition for optimum sperm production. *Advances in Pork Production*. 15: 295-306.
- Wolf, J. y J. Smital. 2009. Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *J. Anim. Sci*. 87: 1620-1627.
- Žaja, I.Ž., M. Samardžija, S. Vince, I. Majić-Balić, M. Vilić, D. Đuričić y S. Milinković-Tur. 2016. Influence of boar breed or hybrid genetic composition on semen quality and seminal plasma biochemical variables. *Animal Reproduction Science*. 164: 169-176.
- Zasiadczyk L., L. Fraser, W. Kordan y K. Wasilewska. 2015. Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates. *Theriogenology*. 83: 1287-1303.

IX. Apéndices

Apéndice 1. Datos de promedio de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, durante el periodo de 1/1/1948 a 4/30/2012 para Lajas, PR, según reportados por “Southeast Regional Climate Center” (SERCC, 2007).

Mes	Promedio de temperatura máxima (°C)	Promedio de temperatura mínima (°C)	Promedio de temperatura promedio (°C)
Enero	30.00	16.06	23.03
Febrero	30.28	16.22	23.25
Marzo	30.72	16.78	23.75
Abril	31.28	18.28	24.78
Mayo	31.83	20.11	25.97
Junio	32.67	20.72	26.69
Julio	33.06	20.44	26.75
Agosto	32.89	20.50	26.69
Septiembre	32.44	20.50	26.47
Octubre	31.94	20.06	26.00
Noviembre	31.39	18.78	25.08
Diciembre	30.56	16.89	23.72

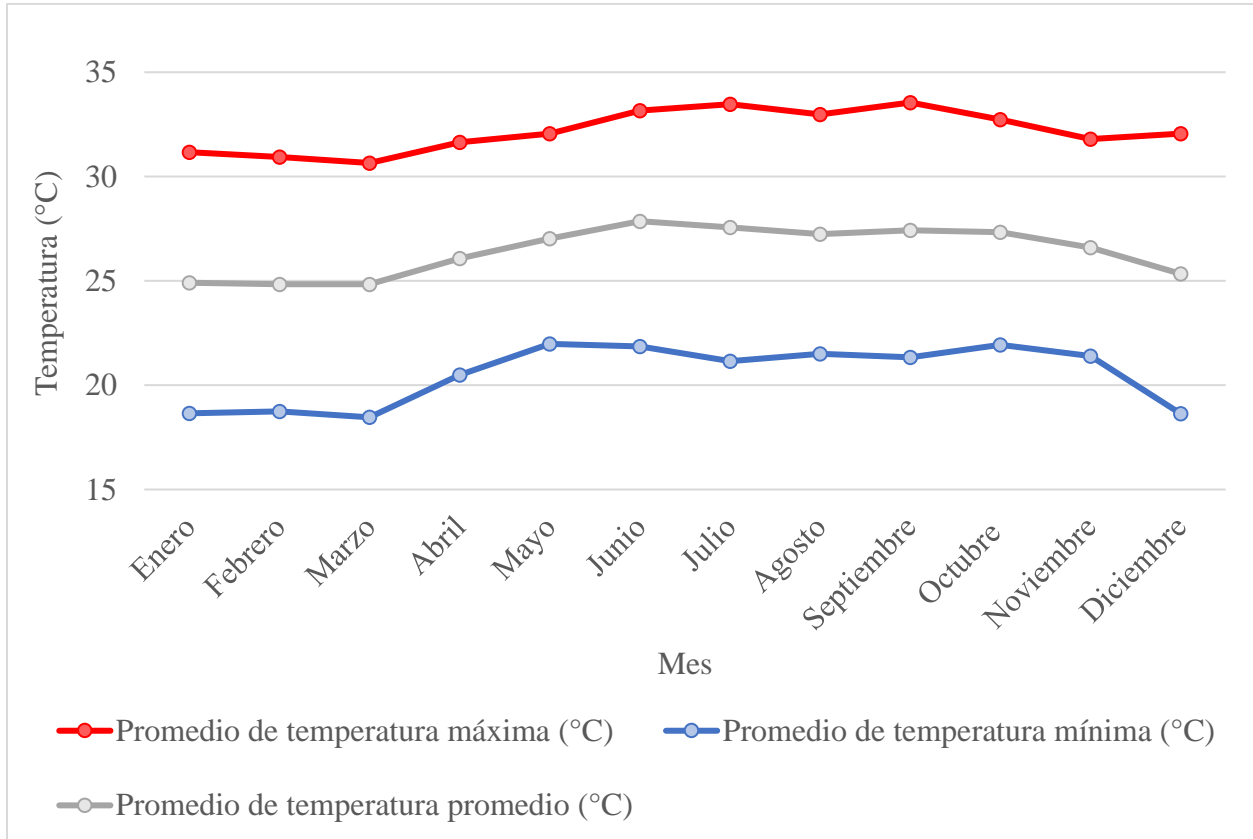
Apéndice 2. Gráfica de promedio de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, durante el periodo de 1/1/1948 y 4/30/2012 para Lajas, PR, según reportados por “Southeast Regional Climate Center” (SERCC, 2007).



Apéndice 3. Datos de promedio de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, según recolectados en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.

Mes	Promedio de temperatura máxima (°C)	Promedio de temperatura mínima (°C)	Promedio de temperatura promedio (°C)
Enero	31.17	18.65	24.91
Febrero	30.94	18.74	24.84
Marzo	30.65	18.46	24.84
Abril	31.64	20.49	26.07
Mayo	32.06	21.98	27.02
Junio	33.17	21.85	27.86
Julio	33.47	21.15	27.57
Agosto	32.98	21.51	27.24
Septiembre	33.55	21.34	27.43
Octubre	32.74	21.93	27.33
Noviembre	31.79	21.39	26.59
Diciembre	32.06	18.63	25.34

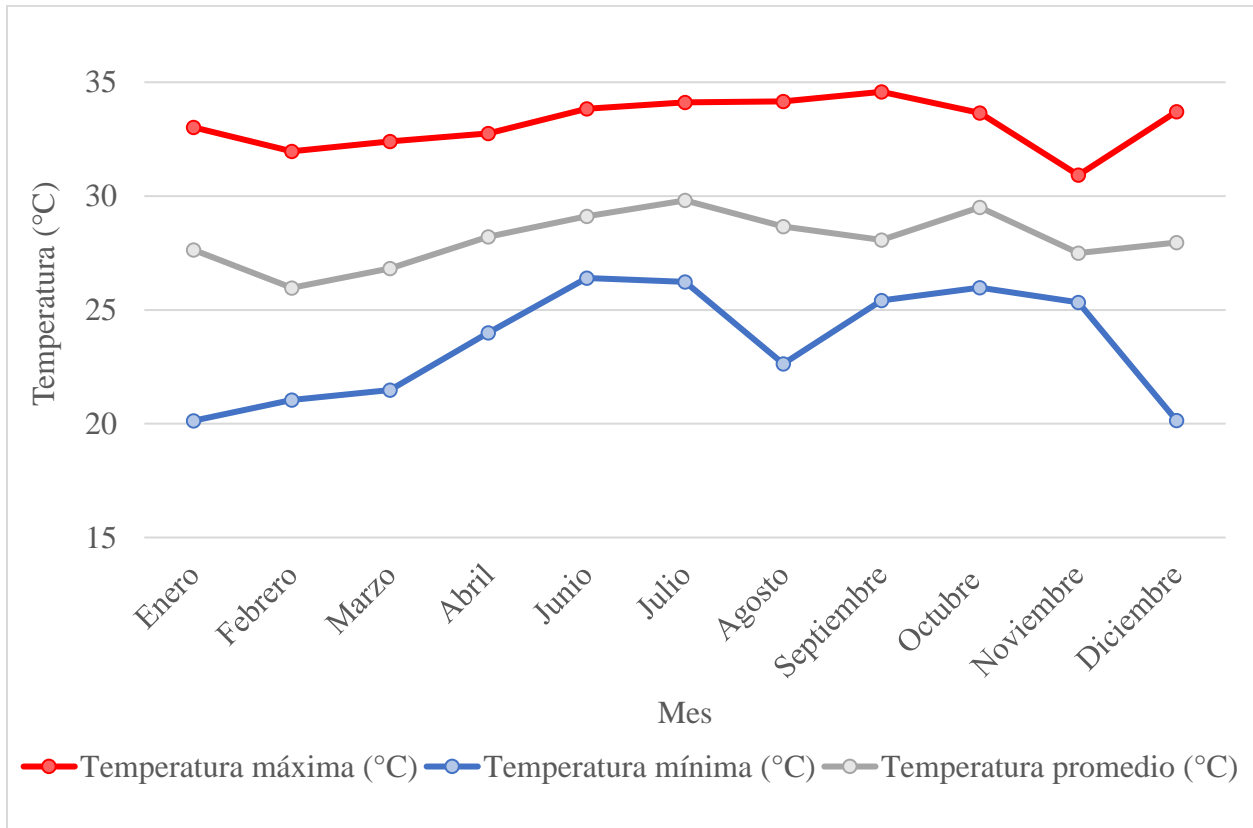
Apéndice 4. Gráfica de promedio de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, según recolectados en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.



Apéndice 5. Datos de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, dentro del corral de colección, en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.

Mes	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura promedio (°C)
Enero	33.02	20.13	27.64
Febrero	31.97	21.04	25.97
Marzo	32.40	21.48	26.82
Abril	32.76	24.00	28.21
Mayo	.	.	.
Junio	33.84	26.40	29.11
Julio	34.12	26.23	29.81
Agosto	34.16	22.63	28.66
Septiembre	34.58	25.41	28.07
Octubre	33.66	25.98	29.51
Noviembre	30.92	25.33	27.50
Diciembre	33.71	20.14	27.96

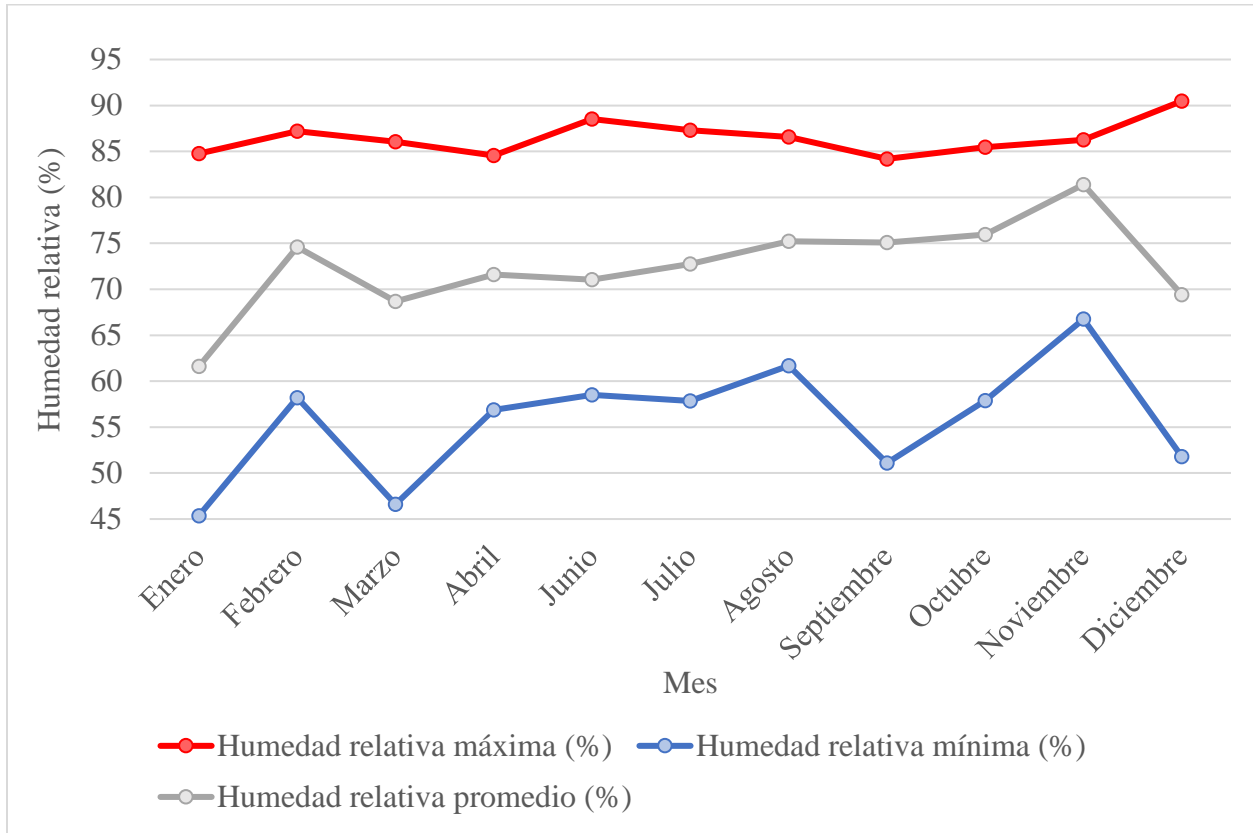
Apéndice 6. Gráfica de temperatura (°C) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, dentro del corral de colección, en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.



Apéndice 7. Datos de humedad relativa (%) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, dentro del corral de colección, en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.

Mes	Humedad relativa máxima (%)	Humedad relativa mínima (%)	Humedad relativa promedio (%)
Enero	84.76	45.36	61.60
Febrero	87.20	58.20	74.59
Marzo	86.07	46.59	68.68
Abril	84.55	56.87	71.60
Mayo	.	.	.
Junio	88.52	58.52	71.05
Julio	87.30	57.85	72.76
Agosto	86.56	61.68	75.23
Septiembre	84.19	51.09	75.10
Octubre	85.47	57.87	75.95
Noviembre	86.26	66.75	81.40
Diciembre	90.48	51.80	69.42

Apéndice 8. Gráfica de humedad relativa (%) máxima, mínima y promedio por mes, para el año 2016, dentro del corral de colección, en la Estación Experimental Agrícola de Lajas, P.R.



Apéndice 9. Datos de la duración de pre-monta, monta y eyaculación transformados.

Obs	NoVerraco	Epoca	Tiempo	Coleccion	TaCo	HR	PreMonta	Monta	Eyaculacion
1	91-1	1	1	1	25.44	50.66	13.22	216.38	520.43
2	32-6	1	2	2	33.02	45.00	128.70	.	.
3	32-6	1	1	1	20.13	84.76	46.00	404.00	620.75
4	91-1	1	2	1	31.82	56.46	49.20	56.05	570.48
5	91-1	1	1	1	22.98	81.41	21.89	100.76	389.21
6	32-6	1	2	1	28.47	61.82	44.63	400.61	323.77
7	32-6	1	1	2	21.04	87.20	59.80	367.80	.
8	91-1	1	2	1	31.97	58.50	19.02	93.55	870.22
9	91-1	1	1	1	21.80	82.82	11.25	129.20	646.18
10	32-6	1	2	2	29.68	62.94	215.76	.	.
11	32-6	1	1	1	23.67	81.77	33.31	159.48	162.34
12	91-1	1	2	1	30.45	60.77	39.76	176.80	918.18
13	91-1	1	1	1	.	.	20.12	186.40	672.01
14	32-6	1	2	1	28.31	82.18	23.33	150.21	375.45
15	32-6	1	1	1	22.66	86.07	39.14	369.48	233.90
16	91-1	1	2	1	26.28	65.20	42.00	180.00	522.00
17	91-1	1	1	1	21.48	77.73	37.24	166.01	1148.67
18	32-6	1	2	2	30.68	62.02	108.87	.	.
19	32-6	1	1	1	22.37	83.04	56.68	261.13	453.52
20	91-1	1	2	1	31.42	57.80	81.30	236.55	681.30
21	91-1	1	1	1	25.07	75.30	81.74	73.47	760.84
22	32-6	1	2	1	32.40	46.59	70.18	364.50	315.92
23	32-6	1	1	1	25.73	75.18	66.56	293.73	275.44
24	91-1	1	2	1	28.81	65.20	34.26	101.58	762.47
25	91-1	1	1	1	24.00	82.32	9.53	99.16	862.59
26	32-6	1	2	1	32.76	56.87	133.93	132.98	137.87
27	32-6	1	1	1	24.98	79.95	57.78	119.98	325.56
28	91-1	1	2	1	29.97	69.89	20.99	119.02	204.85
29	91-1	1	1	1	25.42	74.95	52.03	162.66	562.41
30	32-6	1	2	2	32.19	61.91	66.09	.	.
31	32-6	1	1	1	27.53	84.55	63.14	128.18	162.33
32	91-1	2	2	1	.	.	48.68	304.86	447.11

Obs	NoVerraco	Epoca	Tiempo	Coleccion	TaCo	HR	PreMonta	Monta	Eyaculacion
33	91-1	2	1	1	.	.	92.74	83.00	539.00
34	32-6	2	2	2	.	.	84.36	.	.
35	32-6	2	1	2	.	.	65.64	.	.
36	91-1	2	1	1	.	.	60.50	73.37	815.63
37	32-6	2	2	1	.	.	129.84	209.19	399.72
38	32-6	2	1	1	.	.	47.62	141.59	387.89
39	91-1	2	2	1	.	.	51.09	64.95	582.00
40	91-1	2	1	1	.	.	59.33	80.32	552.87
41	32-6	2	2	1	.	.	170.96	278.73	361.58
42	32-6	2	1	1	29.12	75.53	158.81	205.26	513.77
43	91-1	2	2	1	33.84	58.74	59.95	61.96	699.64
44	91-1	2	1	1	28.01	71.72	32.36	77.41	466.87
45	32-6	2	2	1	26.40	88.52	169.46	106.69	424.56
46	32-6	2	1	1	27.35	73.02	142.98	102.63	410.75
47	91-1	2	2	1	31.01	58.52	29.79	123.53	646.89
48	91-1	2	1	1	26.70	73.72	44.82	88.73	611.88
49	32-6	2	1	1	30.44	71.89	49.59	175.11	341.03
50	91-1	2	2	1	34.12	61.09	45.87	75.03	525.54
51	91-1	2	1	1	26.23	79.40	23.96	93.10	549.70
52	32-6	2	2	2	26.44	87.30	204.93	.	.
53	32-6	2	1	1	28.24	79.00	104.14	86.72	393.35
54	91-1	2	2	1	33.34	57.85	24.13	77.98	579.99
55	32-6	2	1	1	26.84	78.40	32.00	74.77	649.94
56	91-1	2	2	1	33.39	61.91	116.13	109.32	316.72
57	91-1	2	1	1	25.58	86.56	24.79	80.13	430.91
58	32-6	2	2	1	22.63	71.23	169.88	104.81	616.99
59	32-6	2	1	1	28.31	83.65	102.90	137.90	493.26
60	91-1	2	2	1	30.03	77.71	28.99	72.48	382.91
61	91-1	2	1	1	28.29	80.69	17.69	67.33	349.91
62	32-6	2	2	1	34.16	61.68	142.29	126.91	323.83
63	32-6	2	1	1	25.86	82.09	123.99	99.01	461.87
64	91-1	2	2	1	34.58	51.09	17.98	76.84	631.75
65	91-1	2	1	1	25.41	81.97	10.22	90.69	661.66

Obs	NoVerraco	Epoca	Tiempo	Coleccion	TaCo	HR	PreMonta	Monta	Eyaculacion
66	32-6	2	2	1	28.28	81.48	85.96	111.55	516.46
67	32-6	2	1	1	26.21	84.19	126.95	95.72	326.91
68	91-1	2	2	1	30.26	72.20	27.33	63.20	533.30
69	32-6	2	2	1	28.09	64.97	233.22	95.87	427.31
70	91-1	2	2	1	28.09	84.07	24.85	55.19	517.44
71	91-1	2	1	1
72	32-6	2	1	1	27.22	83.35	239.45	119.01	410.30
73	91-1	2	2	1	33.66	57.87	38.14	53.94	527.06
74	91-1	2	1	1	28.09	84.00	18.42	62.77	837.45
75	32-6	2	2	1	33.44	63.41	251.42	96.70	463.79
76	32-6	2	1	1	25.98	85.47	148.97	200.68	365.61
77	91-1	2	2	1	32.56	65.14	79.94	242.07	532.07
78	32-6	1	1	1	25.33	86.26	116.98	296.59	156.33
79	91-1	1	2	1	30.16	79.64	16.26	64.51	613.65
80	32-6	1	2	1	27.94	83.19	105.51	94.85	368.44
81	91-1	1	2	1	30.92	66.75	42.12	64.18	415.27
82	91-1	1	1	1	28.38	73.79	20.37	170.23	656.76
83	32-6	1	2	1	31.69	68.24	66.29	178.97	435.69
84	32-6	1	1	1	27.36	74.41	112.30	92.85	416.38
85	91-1	1	2	1	32.21	55.87	18.23	52.08	554.52
86	91-1	1	1	1	21.48	88.86	12.49	77.66	402.18
87	32-6	1	2	1	33.71	51.93	59.95	74.19	204.29
88	32-6	1	1	1	20.14	81.84	116.68	86.65	206.32
89	91-1	1	2	1	31.37	51.80	22.57	59.11	406.56
90	91-1	1	1	1	21.00	90.48	14.60	70.70	884.45

Obs	TempRectal	logrec	logrec2	logrec3
1	35.72	2.65465	5.38165	6.25658
2	.	4.86522	.	.
3	37.00	3.85015	6.00389	6.43254
4	38.56	3.91602	4.04393	6.34823
5	36.44	3.13070	4.62262	5.96669
6	38.06	3.82057	5.99548	5.78312

Obs	TempRectal	logrec	logrec2	logrec3
7	.	4.10759	5.91025	.
8	37.50	2.99673	4.54913	6.76989
9	35.78	2.50553	4.86907	6.47262
10	.	5.37879	.	.
11	35.94	3.53544	5.07817	5.09583
12	36.94	3.70770	5.18066	6.82348
13	35.61	3.05022	5.23325	6.51176
14	36.39	3.19171	5.01867	5.93079
15	36.72	3.69237	5.91480	5.45916
16	37.44	3.76120	5.19850	6.25958
17	35.50	3.64388	5.11805	7.04723
18	.	4.69930	.	.
19	37.00	4.05491	5.56884	6.11924
20	36.44	4.41037	5.47038	6.52547
21	35.33	4.41570	4.31040	6.63574
22	36.39	4.26521	5.90127	5.75865
23	36.28	4.21302	5.68606	5.62199
24	36.83	3.56275	4.63064	6.63787
25	36.11	2.35423	4.60677	6.76110
26	37.44	4.90476	4.89769	4.93354
27	.	4.07380	4.79563	5.78861
28	36.61	3.09059	4.78766	5.32715
29	35.78	3.97086	5.09779	6.33401
30	.	4.20604	.	.
31	36.22	4.16107	4.86121	5.09577
32	37.67	3.90560	5.72313	6.10504
33	36.28	4.54052	4.43082	6.29157
34	.	4.44688	.	.
35	.	4.19930	.	.
36	35.89	4.11904	4.30905	6.70519
37	38.11	4.87398	5.34801	5.99326
38	36.06	3.88403	4.95997	5.96330
39	36.33	3.95297	4.18890	6.36819

Obs	TempRectal	logrec	logrec2	logrec3
40	36.06	4.09983	4.39839	6.31693
41	37.78	5.14726	5.63382	5.89325
42	36.44	5.07399	5.32914	6.24372
43	37.89	4.11005	4.14250	6.55199
44	35.72	3.50736	4.36195	6.14819
45	36.50	5.13850	4.67926	6.05341
46	36.28	4.96967	4.64083	6.02042
47	37.50	3.42719	4.82455	6.47372
48	36.06	3.82472	4.49681	6.41817
49	36.61	3.92375	5.17111	5.83490
50	37.22	3.84738	4.33113	6.26633
51	35.94	3.21727	4.54436	6.31119
52	.	5.32754	.	.
53	36.44	4.65529	4.47415	5.97724
54	36.50	3.22406	4.36919	6.36473
55	36.28	3.49651	4.32770	6.47842
56	37.72	4.76328	4.70339	5.76117
57	35.50	3.24999	4.39605	6.06822
58	37.11	5.14096	4.66165	6.42647
59	36.33	4.64343	4.93375	6.20306
60	36.56	3.40086	4.29701	5.95041
61	36.72	2.92799	4.22435	5.86053
62	37.67	4.96487	4.85133	5.78330
63	36.11	4.82823	4.60527	6.13745
64	37.06	2.94339	4.35466	6.45008
65	36.11	2.41770	4.51841	6.49626
66	36.67	4.46545	4.72340	6.24893
67	36.17	4.85164	4.57182	5.79274
68	37.06	3.34392	4.16200	6.28096
69	37.50	5.45626	4.57337	6.05985
70	36.50	3.25231	4.02874	6.25082
71
72	36.50	5.48251	4.78758	6.01932

Obs	TempRectal	logrec	logrec2	logrec3
73	.	3.66714	4.00624	6.26921
74	36.11	2.96630	4.15528	6.73155
75	38.28	5.53109	4.58190	6.14159
76	36.44	5.01044	5.30668	5.90430
77	36.67	4.39371	5.49335	6.27865
78	36.44	4.77052	5.69572	5.05835
79	36.28	2.84839	4.18220	6.42105
80	36.89	4.66824	4.56278	5.91199
81	36.72	3.76399	4.17715	6.03133
82	36.44	3.06199	5.14301	6.48884
83	37.33	4.20901	5.19279	6.07922
84	36.50	4.73004	4.54170	6.03400
85	36.11	2.95647	3.97180	6.31990
86	35.28	2.60195	4.36513	5.99938
87	38.00	4.11005	4.32002	5.32442
88	35.67	4.76797	4.47335	5.33426
89	36.28	3.15997	4.09618	6.01019
90	.	2.74727	4.27249	6.78610