

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS SOBRE
LA FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA DE SEMEN OVINO

LEONARDO HERNANDEZ CORREDOR

88223283

SAMIR LEÓN RESTREPO

88168216

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA

PAMPLONA

2019

EFFECTO DE LA INCLUSIÓN DE CONCENTRADO AUTÓLOGO DE PLAQUETAS SOBRE
LA FISIOLÓGÍA ESPERMÁTICA DE SEMEN OVINO

LEONARDO HERNANDEZ CORREDOR

88223283

SAMIR LEÓN RESTREPO

88168216

DIRECTOR:

MVZ, Ph.D. XAVIER LEONARDO JARAMILLO

Trabajo de grado modalidad investigación, para optar por el título de Médico Veterinario

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA

PAMPLONA

2019

DEDICATORIA

Dios Todopoderoso.

A tres personas: Pedro Pablo Corredor, a María Gutiérrez,

Eduardo Hernández, Me enseñaron lo hermoso

Del campo y de la Vida.

A Eduardo, a Samantha y a doña Gloria

Leonardo

A Dios Padre por su amor expresado en Cristo

A mi Madre y mi Padre (Q.E.P.D)

A mí querida esposa Leydi y mis dos pequeños tesoros María Clara y Ana María

Gracias por su apoyo incondicional

Samir

AGRADECIMIENTO

A Xavier Leonardo Jaramillo, nuestro director por enseñarnos lo importante del concentrado autologo de plaquetas, por sus consejos y tiempo...gracias por enseñarnos la cirugía.

A John Jairo Bustamante, por marcarnos el camino a la investigación de la medicina veterinaria.

A Jorge Rubio-Parada, Carlos Salazar, Oscar Buitrago, Yoel Gómez, Richard Baez, Carlos Molina, Pablo Pineda, Tito Alonso, Wilman Carrillo, Genys Carrillo (Hermanos de estudio), horas de sueño, de estudio, de risas (de chistes malos) y de preocupaciones, LO LOGRAMOS

Gracias por acompañarnos en el camino, a Darly, Daniela, Sandra, El paisa, Maikel, Freddy y a todos los demás compañeros de programa que siempre estuvieron pendiente de los “abuelos”.

A las Doctoras Yanet, Irlanda, Melissa por las enseñanzas transmitidas en clase.

A Edwin por su participación en el préstamo de los animales para el proyecto.

Tabla de contenido

ABSTRACT	ix
RESUMEN.....	x
CAPÍTULO I.....	1
1.1 Planteamiento del problema y Justificación	1
1.2 Objetivos.....	2
1.2.1 Objetivo general.....	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
CAPÍTULO II.....	3
Introducción.....	3
2.2 Revisión bibliográfica.....	4
2.2.1 Parámetros típicos medibles en el eyaculado ovino.	4
2.2.1.1 El volumen, color, aspecto.	4
2.2.1.2 Concentración espermática.	4
2.2.1.3 Motilidad espermática	5
2.2.1.4 Motilidad masal.....	6
2.2.1.5 Análisis computarizado de la motilidad espermática	7
2.2.1.6 Espermatozoides vivos y muertos	8
2.2.1.7 Estado del acrosoma.....	9
2.2.1.8 Morfología espermática.....	11
2.2.1.9 Morfometría computarizada.....	11
2.2.2 Parámetros de funcionalidad espermática en ovinos.	14
2.2.2.1 Test de endósmosis (HOST).....	15
2.2.2.2 Estado de condensación de la cromatina.....	18
2.2.3 Concentrado autólogo de plaquetas	19
CAPÍTULO III.....	25
Metodología	25
3.1 Ubicación y caracterización del área experimental	25
3.2 Características y manejo de las unidades experimentales	25
3.2.1 Ovinos seleccionados.....	26
3.2.2 Semen recién colectado.....	26
3.3 Colección y procesado del semen.....	26

3.4 Obtención del concentrado autólogo de plaquetas	27
3.5 Análisis de laboratorio: semen fresco.....	29
3.5.1 Características macroscópicas.	29
3.5.1.2 Volumen, color, aspecto y pH.....	29
3.5.2 Características microscópicas.	30
3.5.2.1 Motilidad espermática.	30
3.5.2.2 Concentración espermática.	30
3.5.2.3 Vitalidad espermática.	31
3.5.2.3 Anormalidades morfológicas.	31
3.5.2.4 Evaluación del acrosoma.....	32
3.5.3 Pruebas de funcionalidad espermática.	33
3.5.3.1 Test de Endosmosis (HOST).....	33
3.5.3.2 Test Azul de Anilina (TAA).....	33
3.5.3.3 Evaluación Computarizada del semen CASA y ASMA.	33
3.6 Metodología estadística	35
CAPÍTULO IV.....	37
4.1 Resultados y discusión.....	37
CAPÍTULO V.	49
5.1 Conclusiones.....	49
5.2 Recomendaciones	50
Referencias	51

Lista de Figuras

Figura 1. Cámara de Neubauer y método de conteo celular (hemocitómetro)	5
Figura 2. Representación de los parámetros del CASA para espermatozoides de ratas durante la capacitación in vitro.	8
Figura 3. Tinción eosina-nigrosina. Los espermatozoides sin tinción están vivos y el espermatozoide con la integridad de la membrana dañada (muerto), se observa de color rosado.	9
Figura 4. Microfotografía de contraste de fase, clasificación de acuerdo al daño del acrosoma. ..	10
Figura 5. Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide.	12
Figura 6. Espermatozoides caprinos en medio HOST, (A) espermatozoide no reactivo (B-J) espermatozoides reaccionados (K-W) espermatozoides fuertemente reaccionados.	17
Figura 7. Uso de azul de anilina en la evaluación de la cromatina (400 X), espermatozoide azul oscuro presenta daño de la cromatina.	19
Figura 8. Separación de las diferentes fracciones de plaquetas después de centrifugada la sangre.	24
Figura 9. Animales de trabajo raza Kathadin.	27
Figura 10. Representación de la metodología de trabajo.	28
Figura 11. Capturas del software ISAS V 1.2, células espermáticas teñidas con Diff quick®.....	35

Lista de tablas

Tabla 1. Variabilidad morfométrica de espermatozoides eyaculados de rumiantes domésticos. ...	13
Tabla 2. Factores de crecimiento, citokinas y moléculas bioactivas asociadas a las plaquetas.	21
Tabla 3. Protocolo para la obtención del concentrado plaquetario según distintos sistemas.	23
Tabla 4. Características generales ($\mu \pm EE$) en el semen fresco y los diferentes tratamiento en ovinos tropicales.	38
Tabla 5. Media y error estándar de los descriptores de motilidad espermática según tratamiento realizado a los ovinos evaluados	43
Tabla 6. Porcentaje de ganancia o pérdida de los parámetros evaluados en la motilidad espermática según tratamiento realizado a los ovinos evaluados	45
Tabla 7. Media y error estándar de los descriptores de morfometría espermática según tratamiento realizado a los ovinos evaluados.	47

ABSTRACT

Plasma rich in platelets (PRP) have been used for healing processes, maxillary oral surgery, arthrology, plastic surgery, although its use in andrology is null; however, there is no information about its effect on sperm motility and morphology. The aim of this study was to compare the effect PRP in inclusion ram semen in the parameters motility and morphometric. Semen samples (n=8) were collected by artificial vagina from two ram located in the North of Santander region, Colombia (L 7°54'N, L 72°30'W). Obtain the blood sample by venous puncture of the jugular the tubes (Citratated and EDTA) centrifuged at 3000 g/3 min, after separation PRP (rich and poor). After the initial evaluation, eppendorf tubes of 2 mL, 500 μ L, saline solution, 10 μ L of fresh semen and 10 μ L PRP (rich or poor) were placed 5 min after preparation. of the samples, (F:fresh, N: saline solution, CPr: citratated platelets rich; Cpp: citratated platelets poor; EPr: EDTA platelets rich; EPp EDTA platelets poor). sperm were analyzed per software the Sperm Class Analyser (ISAS, Proiser, Spain) and values in μ m for length(L), width(W), perimeter(P) and in μ m² for area(A), were calculated. Morphometric for Motility (VSL, VCL, VAP. LIN, STR, WOB, ALH, BCF) parameters were compared between treatments (T) by ANOVA. Significant differences (P<0.001) were found between T for morphometric and motility. According to these results, the sperm head dimensions (SHD) of semen samples with inclusion EPr were bigger and the velocity were higher. An increase in SHD has been previously described due to osmolar adjustment procedures, the same happened with the parameter of motility and linearity, improving the characteristic up to 6% with respect to fresh semen. it is observed that the PRP improves the morphometry and the motility of the ram spermatozoa, thanks to the growth factors and the components of its dense granules

Key words: Ovine, CASA, Plasma, Platelets, EDTA, citrate

RESUMEN

El concentrado autólogo de plaquetas (CAP) se ha utilizado para procesos de cicatrización, en cirugía maxilofacial, artrología, cirugía plástica, aunque su uso en reproducción animal es nulo; no obstante, la información es escasa sobre su efecto en la motilidad y morfología de los espermatozoides. El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de CAP en la inclusión del semen ovino en la evaluación de los parámetros de motilidad y morfometría. Las muestras de semen (n = 8) se recolectaron mediante vagina artificial de dos moruecos ubicados en la región Norte de Santander, Colombia (L 7° 54'N, L 72° 30'W). Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción con tubos citrados y tubos con EDTA centrifugados a 3000 g / 3 min, el CAP se dividió en dos alícuotas, la pobre y la rica de plaquetas. Después de la evaluación inicial, en tubos eppendorf de 2 ml, se adicionaron, solución salina (500 µl), semen fresco (10 µL) y CAP (10 µL), 5 minutos después de la preparación de las muestras, (F: fresca, N: solución salina, CrC: Concentrado rico en plaquetas en citrato; CpC: Concentrado pobre en plaquetas en citrato; CrE: Concentrado rico en plaquetas en EDTA; CpE: Concentrado pobre en plaquetas en EDTA). Los espermatozoides se analizaron mediante el software Sperm Class Analyzer (ISAS, Proiser, España) y se calcularon los valores en µm para longitud (L), ancho (W), perímetro (P) y en µm² para el área (A) para los parámetros morfométricos, para motilidad se estudiaron VSL (velocidad rectilínea), VCL (velocidad curvilínea), VAP (velocidad promedio), LIN (índice de linealidad), STR (índice de rectitud), WOB (índice de oscilación), ALH (desplazamiento lateral de la cabeza), BCF(frecuencia de batido de cola) se compararon los tratamientos (T) mediante ANOVA. Se encontraron diferencias significativas (P <0.001) entre T para morfometría y motilidad. De acuerdo con estos resultados, las dimensiones de la cabeza del esperma (DCE) de las muestras de semen con inclusión de EPr fueron mayores y la velocidad fue mayor. Se ha

informado un aumento en la DCE debido a los procedimientos de ajuste osmolar, lo mismo ocurrió con el parámetro de motilidad y linealidad, mejorando la característica hasta un 6% con respecto al semen fresco. Se observa que el CAP rico mejora la morfometría y la motilidad de los espermatozoides del ovejo, gracias a los factores de crecimiento y los componentes de sus gránulos densos.

Palabras clave: Ovino, CASA, Plasma, Plaquetas, EDTA, Citrato.

CAPÍTULO I.

1.1 Planteamiento del problema y justificación

La inseminación artificial (IA) es una técnica de la biotecnología reproductiva que para ser efectiva depende de la calidad seminal. En el caso de los ovinos, su procesamiento (dilución, enfriamiento y conservación) es estudiado y los daños que sufren las células espermáticas en el proceso de preservación, sobrepasan el 50% de daños (Rubio-Guillen, 2017).

El daño infringido por el proceso de criopreservación puede considerarse la principal causa del bajo rendimiento reproductivo, en este sentido, se han venido utilizando en los diluyentes de congelación, enzimas o sustancias antioxidantes con el fin de proteger la estructura espermática; en cierto modo, la congelación seminal tiene un efecto nocivo, en la motilidad espermática y la integridad de las membranas acrosómica y plasmática, Dominguez et al., (2010) observaron que el aumento de la concentración de plasma seminal provocaba un aumento significativo de la viabilidad y movilidad espermática.

El plasma seminal (PS) tiene como composición: carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales, los cuales influyen en la capacidad fecundante de los espermatozoides. El estudio de las funciones de las proteínas del PS ha permitido su uso en el proceso de criopreservación, con el fin de incrementar la viabilidad espermática post-descongelación (Barrios et al. 2000; Moura y Memili, 2016). Durante la criopreservación, la distribución de fosfolípidos y proteínas en la membrana plasmática se altera y provoca una capacitación prematura del espermatozoide, disminuyendo su viabilidad. Los estudios revelan que los cambios de temperatura afectan la integridad de las células en niveles estructurales por la rotura mecánica de la membrana y por la redistribución de los fosfolípidos en la misma (Watson, 2000). Estos daños se han intentado

disminuir mediante el uso de diferentes crioprotectores y antioxidantes (Hernández-Corredor, 2014). El más empleado ha sido la yema de huevo por su contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL), la cual es la responsable del efecto crioprotector (Pineda, 2002). En vista de lo anterior, se ha propuesto el uso de concentrado autólogo de plaquetas, para la evaluación de su efecto en los parámetros de calidad en el semen ovino.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general.

Evaluar el efecto del concentrado autólogo de plaquetas en el semen ovino, sobre la calidad espermática en semen fresco.

1.2.2 Objetivos específicos.

Comparar los descriptores de morfometría espermática a través del software ASMA en semen fresco de ovinos y determinar el efecto del concentrado autólogo de plaquetas.

Relacionar los descriptores de motilidad espermática a través del software CASA en semen fresco de ovinos y determinar el efecto del concentrado autólogo de plaquetas.

Evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática en semen fresco de ovinos y comparar sus resultados para estimar y determinar el efecto del concentrado autólogo de plaquetas.

Estimar la integridad estructural de la membrana plasmática en semen fresco de ovino y comparar sus resultados para determinar el efecto del concentrado autólogo de plaquetas.

CAPÍTULO II.

Introducción

Los ovinos como rumiantes menores son especialmente importantes en los países en desarrollo si se toma como premisa el punto de vista económico, impacto social e incluso desde la perspectiva ecológica, por esto, su utilización en el rubro alimenticio, sumado a la generación de un ingreso en efectivo mediante inversiones de alto rendimiento y de bajo riesgo (Rubio-Parada, 2010), hacen de estos animales una importante opción dentro de los sistemas de producción sustentables. Es así como, la ganadería ovina como opción de producción posee grandes potencialidades, afianzándose fundamentalmente en la rápida tasa de crecimiento, cortos intervalos generacionales y las grandes ventajas en cuanto al manejo y adaptación que poseen dichas especies alternativas, lo que ha traído como consecuencia que se alcancen altos niveles de producción en cuanto a carne se refiere.

Los ovinos resultan una especie que en Colombia tiene un gran potencial socioeconómico, ya que se podrían establecer explotaciones exitosas en ecosistemas poco útiles para la crianza de bovinos, obteniendo buenos índices en producción de carne. Sin embargo, a pesar de las ventajas comparativas que tienen los pequeños rumiantes y la diversidad de ambientes a los cuales ellos se adaptan, la disponibilidad de información de índole andrológico y programas de mejoramiento del estatus reproductivo que se implementan en machos reproductores de estas especies es escasa si los comparamos con especies tradicionales como los bovinos, bufalinos o porcinos (Grajales y Tovia, 2010).

En la valoración seminal tradicional/convencional se incluyen una serie de pruebas que evalúan algunos factores o parámetros funciones de la célula espermática. No obstante, los

resultados pueden variar de un laboratorio a otro o de un evaluador a otro, dando como resultado del análisis seminal, la clasificación de la muestra como apta o no apta para su uso en inseminación artificial (Hernández-Corredor, 2014). Al realizar la evaluación del semen ovino es importante tomar en cuenta la edad, raza, estado nutricional, condición corporal, actividad sexual, método de colección, época y estado de salud del animal (Grajales, Tovio y Duica, 2011).

2.2 Revisión bibliográfica

2.2.1 Parámetros típicos medibles en el eyaculado ovino.

2.2.1.1 El volumen, color, aspecto.

El volumen de eyaculado no es un parámetro que entregue algún valor importante de la calidad seminal, en los ovinos es común encontrar volúmenes que van desde 0,3 mL hasta 2,1 mL (Yániz et al., 2015; Rubio-Guillen, 2017). Dependiendo del método de colecta los volúmenes aumentan si es con electroeyaculación, al compararlo con la colecta de vagina artificial (atemperada y termoestable) (Hernández-Corredor et al., 2014).

Es importante evaluar el color que puede ir desde blanco lechoso hasta un blanco mate, si se observa un color rosado del semen indica presencia de sangre y puede deberse a lesiones del pene o del aparato reproductor (Madrid-Bury, 2003). Para valorar el aspecto del eyaculado debe inclinarse ligeramente el tubo de colección y dejar correr su contenido por las paredes, en caso de observar grumos, por lo general es la presencia de pus, lo cual es indicativo de procesos inflamatorios. Esta característica notoriamente evidente al mover suavemente el tubo colector de un lado a otro se conoce con el término de piospermia.

2.2.1.2 Concentración espermática. para su evaluación se usan dos técnicas: el hemocitómetro es la técnica más implementada para valorar este importante parámetro, para

valorarla idóneamente, se toma una gota de la muestra de semen previamente sometida a una dilución final de 1:400 con soluciones fijadoras como el formaldehído o citrato de sodio, para llevarla a una cámara de Neubauer (Figura 1), en donde se realiza el conteaje espermático bajo un microscopio óptico y objetivo de 40X. (Hafez y Hafez, 2003).

La espectrofotometría es un método capaz de medir la luz monocromática absorbida por las partículas en suspensión o los espermatozoides. La medición de la densidad óptica de la muestra es comparada frente a una curva patrón estándar previamente validada. Esta comparación permite conocer el número de espermatozoides (Hafez y Hafez, 2003). Existen dos métodos con los que se puede medir la concentración espermática, tales como: colorimetría y citometría de flujo (Pineda, 2002).

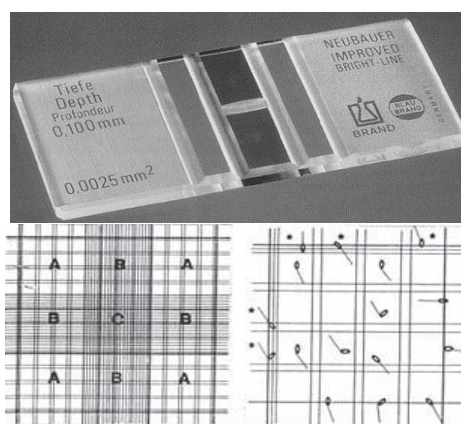


Figura 1. Cámara de Neubauer y método de conteo celular (hemocitómetro) Fuente: Rubio-Guillen, 2017

2.2.1.3 Motilidad espermática. Es un buen indicador de la viabilidad espermática y por ende su relevancia para la fertilidad (Quintero-Moreno 2003). La valoración subjetiva por personas experimentadas es de gran valor, debido a que la información se presenta de forma inmediata, además de ser un método económico y de fácil ejecución (Hammersedt, 1993). En la actualidad existe el análisis computarizado de la motilidad espermática como el Sistema Computarizado

para Análisis de Semen (CASA) (*Computer Assisted Motility Analysis*), con el propósito de tener una evaluación objetiva del movimiento del espermatozoide y la posibilidad de analizar los diferentes patrones de motilidad de las células que se encuentran en una muestra seminal, especialmente luego de haber sido procesada (Matos et al., 2008).

Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación de semen humano, los sistemas CASA se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que sus precios se han hecho más asequibles. En consecuencia, se utilizan cada vez con más frecuencia en veterinaria, especialmente en la especie bovina, tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria, en los centros de IA (Hernández-Corredor et al., 2014).

El CASA es un software utilizado para ver, explorar y analizar imágenes, proporcionando información exacta, precisa y significativa del movimiento de los espermatozoides y además de clasificarlos en subpoblaciones. El análisis de la movilidad espermática actualmente es el parámetro más utilizado para predecir la calidad seminal (Holt, 2000; Versstegen et al., 2002; Dorado, 2003; Hidalgo et al., 2004; García-Herrera et al., 2006; Martínez-Pastor et al., 2010; Silva-Torres y Hernández-Corredor, 2015).

El movimiento de los espermatozoides representa una de las características más importantes asociadas con el potencial fecundante de una muestra de esperma, evidenciando una clara asociación entre la falta de movimiento y la tasa de esterilidad. Sin embargo, dentro de las poblaciones móviles no se ha podido establecer con certeza su asociación con la fecundidad (Quintero-Moreno, 2003, Hernández-Corredor et al., 2018).

2.2.1.4 Motilidad masal. Es una prueba que mide el movimiento espermático de manera grupal y depende de la concentración y viabilidad de las células espermáticas (Grajales, Tovia y Duica, 2011). Para su valoración se utiliza una escala de uno (1) a cuatro (4) en la que uno (1) es

la ausencia de movimiento y cuatro (4) es el máximo movimiento caracterizado por ondas muy oscuras con movimientos muy rápidos (Chenoweth et al., 1993).

2.2.1.5 Análisis computarizado de la motilidad espermática. Según Muiño-Otero et al., (2005) y Amann y Waberski, (2014) quienes hacen una revisión a los trabajos de Glover (1968); Katz y Dott (1975); Katz y Overstreet (1980); O'Connor et al., (1981) y Amann y Hammerstedt (1993) donde estos autores dedicaron trabajo y recursos para intentar eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica de la calidad del semen.

Aunado a lo anteriormente dicho, en las últimas dos décadas se ha unificado criterios a través del uso del Sistema Computarizado de Análisis Seminal (*Computer Assisted Sperm Analysis*, CASA, por sus siglas en Inglés), siendo más objetivo en la evaluación seminal, ya que permite brindar mayor número de parámetros de evaluación y detecta los cambios súbitos en el movimiento espermático (Figura 2), así como la cinemática de los espermatozoides; los cuales no son medibles u observables con el método tradicional, siendo estos los parámetros que de forma directa tipifican un eyaculado, permitiendo conocer la calidad del semen de forma más apropiada, objetiva y repetible (Quintero-Moreno et al., 2004). Mediante el CASA, es más fácil el registro cuantitativo de los datos, permitiendo comparar los resultados con los valores estándar, lo que permite la clasificación y posterior elaboración de un pronóstico de fertilidad de los eyaculados; o posterior procesamiento de análisis estadístico para la comparación o determinación de los efectos de algunos tratamientos (Hernández-Corredor et al., 2018). Estos métodos más rápidos, precisos, menos susceptibles de error, han abierto el campo de estudio de la cinética del movimiento espermático cuyo potencial está empezando a consolidarse (Amann y Waberski, 2014). Sin embargo, también existen desventajas del CASA que están relacionadas con el costo

del equipo, control de calidad, la necesidad extrema de validación y la normalización de las medidas realizadas (Martinez-Pastor et al., 2010).

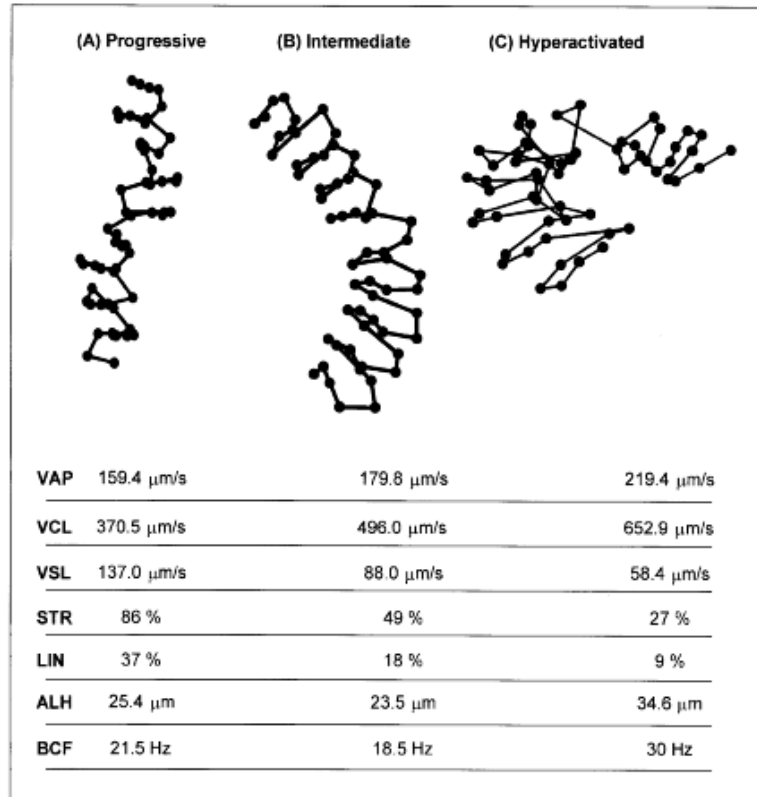


Figura 2. Representación de los parámetros del CASA para espermatozoides de ratas durante la capacitación in vitro. Fuente: Cancel et al., 2000.

2.2.1.6 Espermatozoides vivos y muertos. La vitalidad espermática forma parte de las pruebas no convencionales de valoración de la calidad seminal (Figura 3). Con técnicas muy sencillas como la eosina-nigrosina (EN) puede ser identificado el daño estructural sobre la membrana celular del espermatozoide (indica si una célula está viva o muerta) (Bamba, 1988; Chan et al., 1991; Zhu y Liu, 2000).

La membrana plasmática del espermatozoide, es muy diferente a las células somáticas, posee ácidos insaturados, fosfolípidos y glicolípidos, predominando los glicerofosfolípidos entre ellos la

fosfatidilcolina (FC) y la fosfatidiletanolamina (FE), cuando las células espermáticas maduran la FC disminuye en membrana de los espermatozoides caprinos y aumentan en los espermatozoides de cerdos y ovejos, mientras que la FE si disminuye en todas las especies a medida que van madurando (Rana et al., 1991). Estos cambios sencillos permiten usar tinciones supravitales como azul de tripan (simple) o eosina-nigrosina (EN) (combinación).



Figura 3. Tinción eosina-nigrosina. Los espermatozoides sin tinción están vivos y el espermatozoide con la integridad de la membrana dañada (muerto), se observa de color rosado. (Fuente: Lossada, 2014).

2.2.1.7 Estado del acrosoma. El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación y esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo, tanto para semen fresco, como para descongelado (Rubio-Guillén, 2006). Hasta ahora se conoce que, un espermatozoide fértil de ovino, debe tener el acrosoma en perfectas condiciones, donde se puedan distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal, con su borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas (Hafez y Hafez, 2003).

La morfología del acrosoma en reproductores tiene un papel fundamental en la fecundación, es por ello que muestras seminales con alto porcentaje de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fecundación baja (Quintero-Moreno, 2003; Sepúlveda et al., 2018).

Sin embargo, la manera más rápida de determinar el estado del acrosoma en aquellas especies donde el espermatozoide es lo suficientemente grande como para permitirlo, es fijar la muestra en una solución de glutaldehído al 2 ó 3% y visualizar seguidamente de forma directa la estructura acrosomal en un microscopio con contraste de fases (Pineda, 2002). En el caso de ovinos y caprinos, con frotis teñidos de EN (Rubio-Guillén et al., 2012) puede ser observada con facilidad la presencia del acrosoma intacto y cuando el mismo esté ausente, o alterado contabilizándose como acrosoma alterado (*Damage Apical Ridge*); debido al tamaño de las cabezas espermáticas en estas especies que hace permisiva la observación clara del borde apical con ayuda del objetivo de inmersión (100X).

La metodología descrita por Pursel et al., (1972) y distinguen: borde apical normal (NAR) correspondiente a espermatozoides con acrosoma intacto, borde apical dañado (DAR), borde apical perdido (MAR) y borde apical suelto (LAC). (Figura 4)

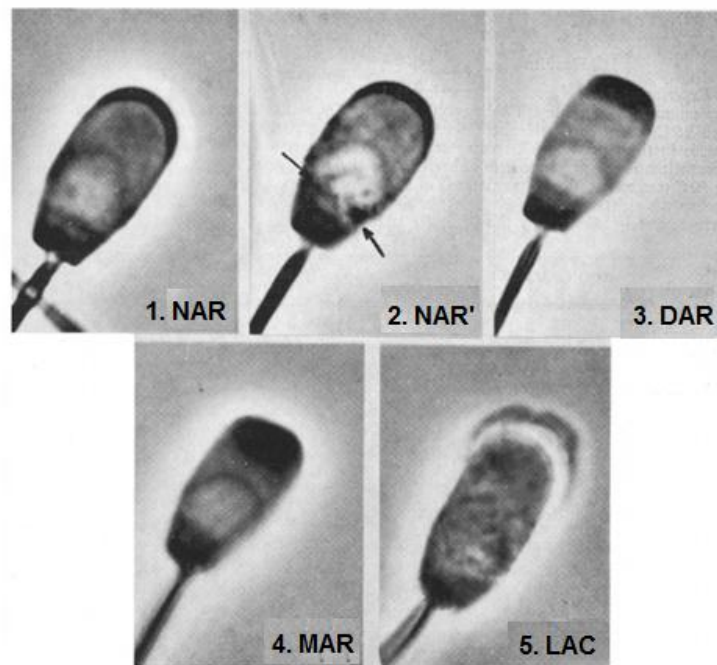


Figura 4. Microfotografía de contraste de fase, Clasificación de acuerdo al daño del acrosoma. Fuente: Pursel y et al., 1972. Modificado por los autores

2.2.1.8 Morfología espermática. Las anomalías morfológicas se clasifican en primarias, secundarias y recientemente se toma la nomenclatura de terciarias para las Teriatrogénicas (Producidas por el Médico Veterinario) (Rubio-Guillen, 2017). Las primarias se originan en el testículo y se relacionan con defectos de la cabeza espermática, acrosoma y presencia de gota citoplasmática proximal (Chenoweth, 1997); las secundarias se originan en el epidídimo y están relacionadas con la presencia de gota citoplasmática distal y otros defectos del flagelo espermático (Spitzer, 2000). La producción de espermatozoides anormales puede deberse a la edad, problemas nutricionales, enfermedades, factores ambientales (calor, heridas por traumatismos, sustancias tóxicas, cambio de ambiente, entre otros), como por razones hormonales o genéticas (Madrid-Bury, 2002). La comprensión del significado de las anomalías espermáticas, su incidencia en la muestra evaluada, así como la causa y el porqué de su ocurrencia, le permitirá al evaluador hacer un pronóstico de la fertilidad futura del macho reproductor y del tratamiento a seguir para poder recuperarse, resultando muy importante recordar que las células anormales en el eyaculado reflejan trastornos de la función de los testículos o del epidídimo (Hafez y Hafez, 2003).

2.2.1.9 Morfometría computarizada. En mamíferos, incluyendo a los ovinos, la valoración computarizada de la morfología espermática (*Automated Sperm Morphology Analysis*, ASMA), se viene utilizando desde hace algún tiempo en forma experimental para determinar las dimensiones individuales de los espermatozoides, habiéndose obtenido resultados muy interesantes (Yániz et al., 2015). A medida que se han sofisticado las tecnologías reproductivas que estudian las características y funciones de los espermatozoides se ha hecho obvio que existe una considerable heterogeneidad en los eyaculados de animales domésticos (González et al.,

2008; Nava Trujillo et al., 2012). El análisis computarizado que se hace sobre los espermatozoides de una muestra seminal es en parte responsable de la detección de esta heterogeneidad (Figura 5) y está siendo utilizado actualmente para realizar evaluaciones seminales con mayor objetividad y sensibilidad (Gadea, 2005). Valoraciones de este tipo, permiten la exploración rápida de un elevado número de espermatozoides con la obtención de mediciones precisas y repetibles de las dimensiones, garantizando una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide (Quintero-Moreno et al., 2015).

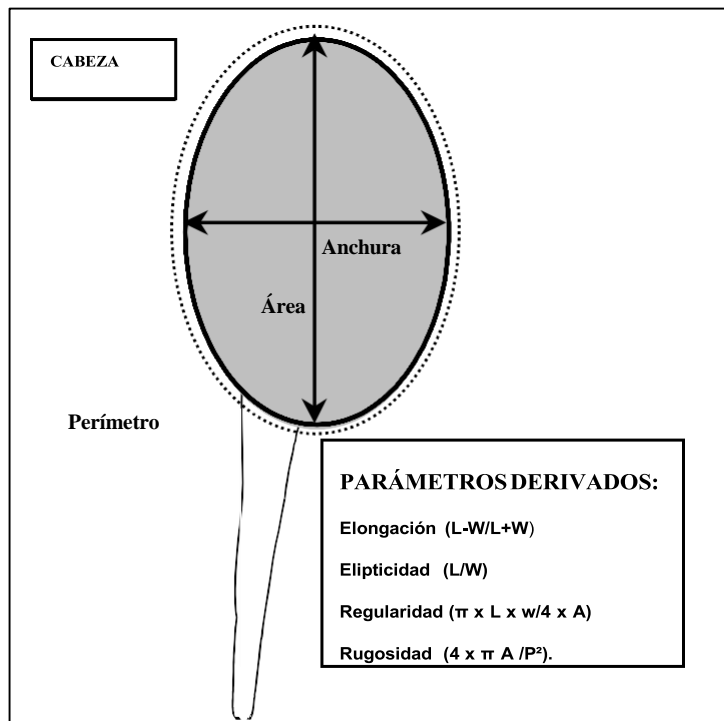


Figura 5. Parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide. (Fuente: Buzón; 2013).

Tabla 1.

Variabilidad morfométrica de espermatozoides eyaculados de rumiantes domésticos.

VARIABLE	<i>Bos taurus</i>	<i>Ovis aries</i>	<i>Capra hircus</i>
MORFOMÉTRICA	TORO	MORUECO	CAPRINO
Largo Cabeza (μm)	9,77	8,20	8,27
Ancho cabeza (μm)	4,30	4,30	4,25
Pieza intermedia (μm)	9,38	14,00	11,38
Pieza principal (μm)	36,93	42,50	39,75
Flagelo Total (μm)	46,76	56,50	51,13
Espermatozoide (μm)	53,53	64,70	59,39

Modificado de: García-Vázquez et al., 2016

Calibrando el Software para cada especie en particular, las mediciones pueden ser efectuadas utilizando un objetivo de inmersión (100X), en donde se pueden realizar cuatro mediciones lineales básicas sobre el espermatozoide: se sabe que las medidas son en micrómetros: Largo (L, μm), ancho (W, μm), Área (A, μm^2) y perímetro (P, μm). Luego a partir de estos cuatro (4) parámetros se pueden calcular otras a partir de cocientes: Elipticidad (L/W), Rugosidad ($4\pi*A/P^2$), Elongación (L-W)/(L+W) y regularidad ($\pi*LW/4A$). (Tabla 1)

En ovinos, ha sido una de las especies donde se ha relacionado idóneamente la morfometría espermática y la fertilidad. De acuerdo con De Paz et al., (2011), esta relación también depende de la metodología de evaluación usada, según este equipo de trabajo, mejores resultados se obtienen con un sistema basado en un microscopio óptico de luz clara con cámara digital y

análisis convencional de imágenes. El mismo autor consiguió demostrar que el largo de la pieza intermedia en moruecos no está relacionado con la fertilidad en campo. En contraste, otros autores no han conseguido estrecha relación entre los valores medios de diferentes dimensiones de cabeza espermática, sino más bien, grandemente asociado a la proporción de espermatozoides ovinos agrupados en subpoblaciones de cabeza espermática pequeña o grande (Maroto-Morales et al., 2012). La distribución de subpoblaciones espermáticas ovinas entre ejemplares de alta y baja fertilidad son diferentes; espermatozoides que exhiben movimientos lineales rápidos y una grande y alargada cabeza espermática son los de mayor fertilidad en campo (Yániz et al., 2015). Similar a lo encontrado para el caso de los toros, donde se relaciona satisfactoriamente la morfometría y la fertilidad al primer servicio (Rubio-Guillén, 2017).

2.2.2 Parámetros de funcionalidad espermática en ovinos.

Para definir funcionalidad espermática, dentro de una muestra seminal fresca, refrigerada o criopreservada, un gran número de espermatozoides debe poseer cualidades determinantes para la fertilización, como motilidad progresiva, morfología aceptable, metabolismo para la producción de energía, capacidad para una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, integridad de la función acrosómica, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Dorado et al., 2010; Buzón, 2013). Sin embargo, medir todos estos parámetros con una sola prueba podría sesgar los resultados, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática (Martínez-Pastor et al., 2010), pudiendo así, subestimar o sobrestimar la capacidad fecundante de una muestra seminal dada. Así mismo, valorar esta funcionalidad mediante un conjunto numeroso de pruebas dentro de un análisis minucioso completo es impráctico y antieconómico para los que

tienen a cargo la labor de evaluar muestras seminales en los centros de IA o en los programas reproductivos (Evaluaciones de la aptitud reproductiva) de los machos reproductores usados periódicamente en montas controladas (Rubio-Guillen, 2017).

Estas pruebas no convencionales y alternativas de valoración de la funcionalidad del espermatozoide incluyen, el estado del acrosoma, la movilidad y viabilidad, la resistencia de la membrana espermática a cambios súbitos de osmolaridad. Siendo esto último, importante estudiarlo debido a que el estrés osmótico es un notorio mecanismo que involucra aspectos de resistencia espermática al proceso de criopreservación. La crioinjuria celular es frecuentemente ocasionada por cambios de presión osmótica producidos durante el proceso de congelación y descongelación de una dosis seminal (Varisli et al., 2009).

Dentro de las pruebas desarrolladas a partir de este fenómeno destacan tres: el test de endósmosis, el test de resistencia osmótica y el shock hiperosmótico.

2.2.2.1 Test de endósmosis (HOST, Hypoosmotic Swelling Test). En condiciones fisiológicas normales, la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide está bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta; por lo tanto, la prueba hiposmótica es un buen indicador del funcionamiento de la membrana espermática (Tamuli y Watson, 1994); a diferencia de las tinciones vitales, que solo permiten ver la integridad morfológica de la membrana (Nava-Trujillo et al., 2012).

En 1984, Jeyendran et al., demostraron en semen humano cómo una prueba sencilla y rápida como el HOST (*Hypoosmotic Swelling Test*) presentaba una alta correlación con el test de penetración en ovocito de hámster en semen humano, dicha relación puede ser explicada debido la incubación en un medio hiposmótico causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica intracelular con la del medio extracelular (Rana y et al., 1991).

Para que esta respuesta se produzca, la MP del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en los espermatozoides un hinchamiento y enrollamiento del flagelo.

Cada especie en particular tiene sus propiedades coloidosmóticas, referidas a la incubación en medios anisomóticos (Figura 6). De acuerdo a este patrón de incubación hiposmótica se puede relacionar idóneamente los resultados de este test HOST con otros parámetros de calidad espermática. En rumiantes, como en otros animales domésticos, se han señalado correlaciones altas y positivas entre el HOST y el porcentaje de espermatozoides vivos, la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y la fertilidad *in vivo* e *in vitro*, tanto del semen fresco, como para el semen descongelado (Aisen et al., 2004; Rubio-Guillén, 2006). Así mismo, en rumiantes, se ha sugerido el uso de fructosa o citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/L (Correa y Zavos, 1994; Aisen et al., 2004). Aunque algunos autores prefieren trabajar a una presión osmótica de 150 mOsm/L (Zhu y Liu, 2000; Vera-Muñoz, 2001; Quintero-Moreno et al., 2007; Rubio-Guillén et al., 2009) para evitar falsos negativos producto de la disrupción de la membrana plasmática a causa del estrés hipotónico severo

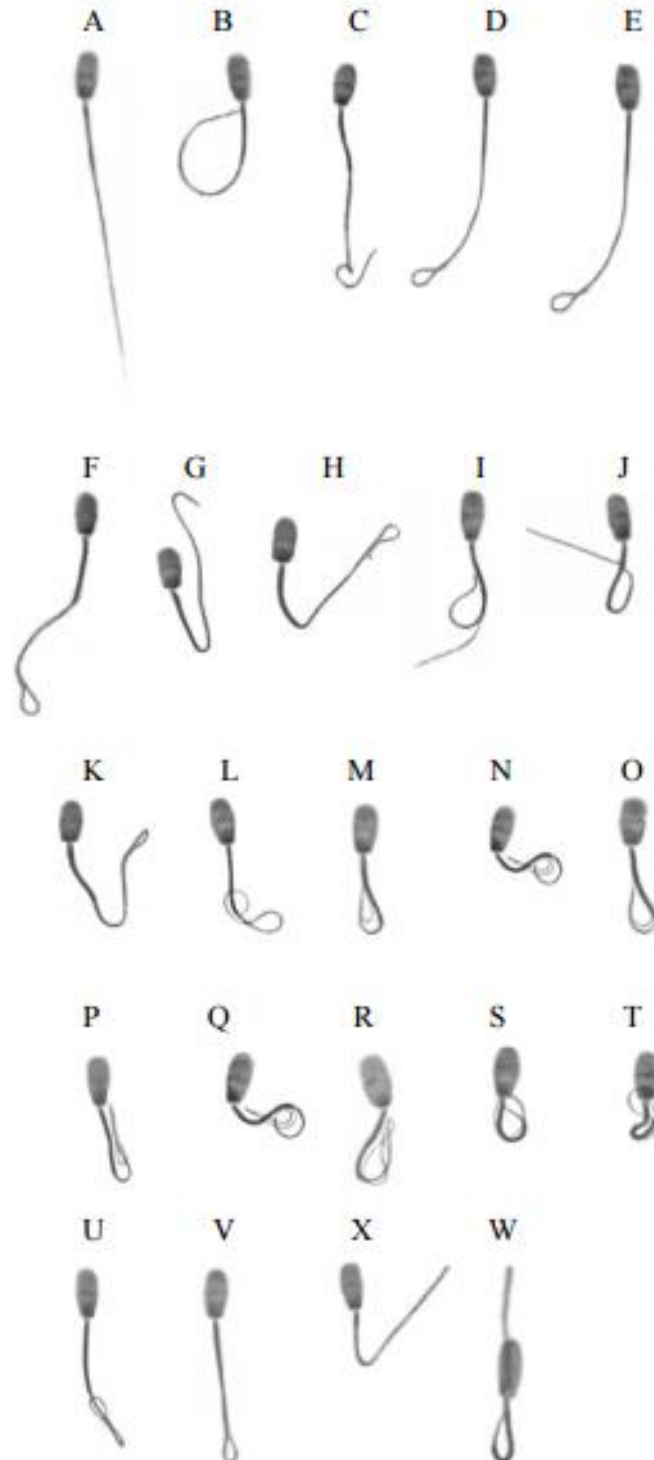


Figura 6. Espermatozoides caprinos en medio HOST, (A) espermatozoide no reactivo (B-J) espermatozoides reaccionados (K-W) espermatozoides fuertemente reaccionados.

Fuente: Fonseca et al., 2005.

2.2.2.2 Estado de condensación de la cromatina. El estado de la cromatina del ADN en los espermatozoides puede determinarse “*in vitro*” en base a su susceptibilidad a la descondesación y ha sido relacionada positivamente con la fertilidad en humanos, ovejos, cerdos y toros (Madrid-Bury et al., 2005). La condensación de la cromatina se produce mediante la ruptura de los puentes disulfuro, formando complejos con iones metálicos divalentes, especialmente con el zinc, que estabiliza la cromatina espermática. Siendo la integridad del ADN de la célula espermática de vital importancia para el desarrollo de embriones normales, ya que, la fecundación de ovocitos con espermatozoides que tengan el ADN dañado, puede tener un impacto negativo en el desarrollo fetal y en la salud de la cría a lo largo de toda su vida (Aitken et al., 2007). Desafortunadamente, la pérdida de la habilidad de los espermatozoides con el ADN dañado de mantener un desarrollo normal del embrión, puede ocurrir antes que se pierda su habilidad para fertilizar ovocitos y además, puede no ser observada cuando se hace la valoración de las características *in vitro* a través de los métodos convencionales (Hidalgo et al., 2006). Esto significa que una población de espermatozoides puede parecer normal en el laboratorio y, sin embargo, su cromatina puede estar dañada, no siendo funcionales al momento de la fertilización (Hernández-Corredor, 2017)

Desde 1999, Franken et al. Evaluaron el azul de anilina en semen humano, técnica conocida para la evaluación seminal en los laboratorios médicos, mientras que en veterinaria, no fue hasta el estudio de Ahmad et al., (2015) en búfalos, que comenzó su utilización; el colorante es muy económico y de fácil manejo, se une a la cromatina, cuando hay una condensación de ésta debido a la lisina presente en la cromatina rica en histonas genera una coloración azul-violeta intensa, cuando se une a la cromatina rica en protaminas, generará una coloración azul pálida.(Figura 7)

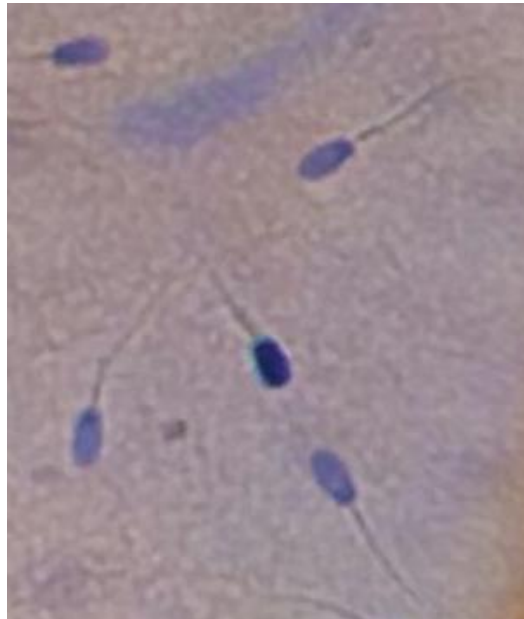


Figura 7. Uso de Azul de Anilina en la evaluación de la cromatina (400 X), espermatozoide azul oscuro presenta daño de la cromatina.

Fuente: Hernández-Corredor (2017).

2.2.3 Concentrado autólogo de plaquetas (CAP).

Según lo define Wu et al. (2016), es una fracción del plasma sanguíneo, obtenido por centrifugación, desde 1997 Whitman, obtuvo gel de plaquetas, con un doble centrifugado entre 2400 y 5600 revoluciones por minuto (RPM), luego en 1998 Marx obtiene un plasma rico en plaquetas, con un procedimiento de doble centrifugado y activación mediante trombina bovina, un año después Anitua et al. (2004) obtienen plasma rico en plaquetas, con pequeños volúmenes y un solo centrifugado, el CAP se ha usado ampliamente en medicina humana, en odontología, oftalmología, cirugía cosmética y en ortopedia (Moreno et al., 2015). Sin embargo, en la medicina veterinaria, en equinos con problemas de ligamentos, tendones y osteoartritis (Textor et al., 2011), en ovejas con infarto estimulando la formación de células y vasos sanguíneos (Bonilla et al. 2017), en cerdos estudiaron la capacidad osteogénica en trepanaciones mandibulares (Castañeda-Vega et al. 2010), en caninos se han desarrollado su uso clínico y en estudios

experimentales de regeneración ósea maxilar, apendicular y en pruebas de osteointegración (Moreno et al. 2015; Silva et al. 2012)

Las plaquetas son derivados de los megacariocitos, células que poseen gránulos α que contienen proteínas secretoras, pertenecen a la familia de los factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, que influyen poderosamente en la cicatrización de las heridas (PDGF, IGF-I, IGF-II, TGF, EGF, FGF) y gránulos densos (ATP, Calcio, serotonina), intervienen en aceleración y la modulación en los procesos de cicatrización a través de los factores de crecimiento (FC) (Carmona, Argüelles, Predes; 2008).

Aunque autores como Smyth et al. (2009), tiene en cuenta tres tipos de compartimientos en las células plaquetarias, como los gránulos alfa, los densos y lisosomas, y cuando éstas son activadas por la trombina pueden liberar más de 300 proteínas. Las plaquetas no son solo células de almacenamiento de moléculas bioactivas, también generan mediadores derivados de lípidos como el tromboxano A₂ y participan en el metabolismo transcelular, generando la producción de moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias. Además, las plaquetas tienen mecanismos únicos y extranucleares para traducir mRNA a proteína para producir interleucina-1 β y el factor tisular, para ayudar a la hemostasia y la inflamación (Weyrich et al., 2009)

Según Rodríguez, Palomar y García, (2012). Los FC reportados se encuentran : El FC transformante (TGF)- β (que incluye los isómeros β 1 y β 2), el FC de células epiteliales (ECGF), el FG epidérmico (EGF), el FC endotelial derivado de las plaquetas (PDEGF), el factor angiogénico derivado de las plaquetas (PDAF), factor derivado de las plaquetas (PDGF, $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$), el factor plaquetario 4 (PF4), el FC insulínico (IGF), la interleucina (IL-1), la fibronectina, el fibrinógeno, la osteocalcina, la osteoconectina, la vitronectina y la trombospondina (TSP-1) (Metcalf et al., 2013, Tabla 2)

Mazzocca et al. (2013) determina que no solo hay diferencias entre los protocolos para la preparación de los CAP, existen variaciones biológicas entre individuos y estas pueden cambiar día a día, el tamaño de las plaquetas y la densidad puede variar dependiendo del tamaño y distribución de los megacariocitos precursores.

Tabla 2.

Factores de crecimiento, citokinas y moléculas bioactivas asociadas a las plaquetas.

	Moléculas	Función biológica
α -Granulos		
Factores de crecimiento	PDGF	Quimio atracción y proliferación celular
	TGF- β	Promotores de matriz de síntesis
	VEGF	Angiogénesis
	EGF	Proliferación celular
	ECGF	Proliferación endotelial angiogénesis
	FGF	Mediador de angiogénesis
	IGF-I, II	Proliferación celular, maduración, síntesis de matriz del hueso
	HGF	Crecimiento celular y motilidad de células epiteliales
	PDAF	Angiogénesis
Citoquinas y quimiocinas	RANTES, IL-1 β MIP-1 α ,	Quimiotaxis, proliferación celular y diferenciación,
	MCP-3	angiogénesis
Proteínas adhesivas	Fibrinógeno	Formación durante la cascada de la coagulación
	Fibronectina	Blindaje a la superficie celular
	Vitronectina	Células de adhesión, quimiotaxis
	Thrombospondina-1	Inhibidor de la angiogénesis
Proteínas básicas	Factor plaquetario 4	Inhibidor de la angiogénesis

	β -Thromboglobulina	Activación plaquetaria, inhibidor de angiogénesis
	Endostatina	Inhibidor endotelial y angiogénesis
Proteasas y antiproteasas	TIMP-4	Regulador de metaloproteínas y degradación de la matrix
	MMP-4	Degradación de matrix
	α 1-Antitripsina	Inhibidores de proteasas y enzimas
Glicoproteínas de membrana	CD40L	Inflamación, síntesis de interleukinas, producción de integrinas, adhesión plaquetaria integral
	P-selectina	Células de adhesión vascular, blindaje y reclutamiento de leucocitos en inflamaciones tisulares
Proteínas antimicrobianas	Thromocidinas	Propiedades bacteriológicas y fúngicas
Morfogénesis de huesos	BMP-2, BMP-4, BMP-6	Iniciación y mantenimiento en la fractura de huesos, propiedades osteoinductivas
Factores de la coagulación	Factor V, factor XI, proteína S, antithrombina	Formación del coágulo
Gránulos densos	ADP	Promotores de agregación plaquetaria
	ATP	Participación en la repuesta plaquetaria en repuesta al colágeno
	Ca ⁺⁺	Agregación plaquetaria formación de la fibrina, modulación de los keratinocitos, proliferación y diferenciación
	Histamina	Incrementan la permeabilidad capilar, actividad de macrófagos, efectos pro y anti inflamatorios
	Dopamina	Neurotransmisor, presión de sangre
	Serotonina	Vasoconstricción incremento de la permeabilidad capilar

Catecolaminas	Hormona liberadora de la glándula adrenal en respuesta al stress
Tromboxanos	Vasoconstricción, agregación plaquetaria y formación del coagulo

Fuente: Metcalf et al. (2013)

La desgranulación de las plaquetas lleva a la activación de las proteínas, cuando se le adiciona carbohidratos e histonas, pasados 10 minutos de formado el coágulo el 95 % de los FC se encuentran ya en el tejido (Quinn, 2005).

Al CAP es una fracción concentrada de plaquetas, superior a los niveles basales, investigadores como Anitua et al., (2004) y Rodríguez, Palomar y García, (2012). Sugirieron que el PRP debería alcanzar una concentración en plaquetas de 3 a 5 veces superior al nivel normal, cuando se centrifuga la sangre anticoagulada se forman tres capas la superior (densidad 1,03), compuesta por plasma, la capa media (densidad 1,06), compuesta por glóbulos blancos y plaquetas y la capa inferior (densidad 1,09), compuesta por glóbulos rojos. Figura 8.

Tabla 3.

Protocolo para la obtención del concentrado plaquetario según distintos sistemas

	Centrifugado 1	Centrifugado 2
CURASAN KIT	10 min/2400 rpm	15 min/3600 rpm
SMART PREP	6 min/5600 rpm	6 min/2400 rpm
FRIADENT-SCHÜTZE	10 min/2400 rpm	15 min/3600 rpm
PCCS SYSTEM	3,45 min/3000 rpm	13 min/3000 rpm
PRGF	7 min/1400 rpm	

Fuente: Wu et al. (2007)

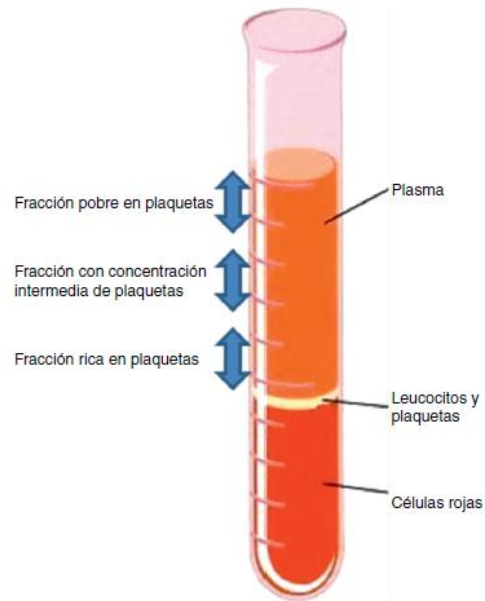


Figura 8. Separación de las diferentes fracciones de plaquetas después de centrifugada la sangre

Fuente: Rodríguez, Palomar y García, (2012)

Según Marx (2001), para mantener la integridad de la membrana de las plaquetas se usa anticoagulante como citrato ácido de dextrosa (el citrato secuestra el calcio y bloquea la cascada de la coagulación, y la dextrosa proporciona los nutrientes que hacen viables a las plaquetas), y velocidades lentas de centrifugación (son parámetros estándar de centrifugado: 1.400 RPM durante 7 minutos), se encuentran varios protocolos para obtener el concentrado autólogo de plaquetas (Tabla 3)

CAPÍTULO III.

3.1 Ubicación y caracterización del área experimental

El estudio fue realizado en el Unidad de producción Siete Colores, sector “anillo vial occidental” justo en la vía que conduce del municipio de Los Patios al municipio del Zulia (Norte de Santander). Ubicada en el municipio Los Patios, en una zona agro ecológicamente caracterizada como bosque seco tropical, aproximadamente a 300 msnm y posee una temperatura anual entre 29,5 y 34°C, con precipitaciones medias por año entre 560 y 810 mm, repartidas en dos picos de lluvias bajo un patrón de estructura bimodal; siendo realizada la parte experimental de este ensayo durante la época seca y cálida en un periodo comprendido entre el mes de enero y abril de 2019.

Se valoraron las muestras recién colectadas (Características macro y microscópicas de los eyaculados frescos) fue realizada inmediatamente en la Unidad de Producción. Así como aquellas pruebas donde era necesario fijar y evaluar las muestras de manera mediata (Vitalidad, NAR, HOST, y Morfología) fueron realizadas al momento de la colecta.

3.2 Características y manejo de las unidades experimentales

Se utilizaron muestras seminales recién colectadas de dos (2) ovinos Katahdin genéticamente probados y de razas adaptadas a condiciones tropicales, los cuales han sido usados en los últimos años en la Unidad de Producción. (Figura 9)

Para la inclusión de los animales al proceso de evaluación seminal fueron necesarios algunos parámetros de calidad, tanto para los ovinos, como para el semen analizado, tal como se describe a continuación:

3.2.1 Ovinos seleccionados.

- Condición corporal óptima de dos punto cinco (2,5) a cuatro (4), en una escala de uno (1) al cinco (5) para ovejoes reproductores. Donde uno (1) representa un animal emaciado y cinco (5) obesidad extrema.
- Libres de enfermedades infectocontagiosas (Brucelosis, Leptospira, Tuberculosis, Campylobacteriosis).
- Solo animales entrenados para colecta parafisiológica con vagina artificial.

3.2.2 Semen recién colectado.

- Motilidad masal mayor a tres (3) en escala de uno (1) al cuatro (4).
- Motilidad individual progresiva mayor a 65%.
- Concentración mayor a 2500 millones de espermatozoides/mL
- Vitalidad y normozoospermia mayor a 70%.

3.3 Colección y procesado del semen

Los eyaculados fueron colectados los sábados entre las 7:00 y 10:00 de la mañana, mediante vagina artificial atemperada a 39°C, durante cuatro semanas consecutivas. Este horario matutino permitía aprovechar la parte más fresca de la mañana, minimizando el distrés calórico y aprovechando el pico de testosterona de la madrugada y cercano al amanecer (Senger, 2006).

Las primeras tres (3) semanas de colección fueron usadas como pre-ensayo para acostumbrar los reproductores a la colecta semanal y modular la espermatogénesis de estos animales, para que no estuviesen sometidos al sobreuso por exposición a hembras, ni a espermatozoides envejecidos por periodos largos de descanso. Así, se obtuvieron un total de 4 repeticiones de los dos (2) ovejoes reproductores, en lo que fueron cuatro semanas efectivas de trabajo para cada macho. Después de la evaluación seminal de rutina, las muestras clasificadas como idóneas para la evaluación, se preservaron a 37°C, mientras se realizaron las evaluaciones previas.



Figura 9. Animales de trabajo raza katahdin.

Fuente: Autores, 2019

3.4 Obtención del concentrado autólogo de plaquetas

A los animales después de la colecta seminal, se procedió a limpiar con alcohol la zona del cuello para obtener la muestra de sangre por venopunción de la yugular, por medio de un vacutainer® (Becton, Dickinson and company) calibre 18, se tomó el capuchón plástico (Camisa)

colocando la aguja, con la mano enguantada se fleba la vena para la toma de la misma, los tubos (citratado y EDTA) son llenados aproximadamente 4 mL, se tomaron 2 alícuotas de 2 mL en tubos eppendorf (2mL), llevados a una microcentrifuga centrifuga (Thermo scientific Spreso® shanghai, china) a 3000 g por 3 minutos, luego de la separación se obtuvo el CAP pobre y el rico dependiendo del tubo de la toma de la muestra (citratados o con EDTA).

Después de la evaluación inicial se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, 500 μ L, de suero fisiológico, 10 μ L de semen fresco y 10 μ L de concentrado autólogo de plaquetas (rico o pobre) a los 5 minutos de la preparación se comenzó la evaluación de las muestras (figura 10)

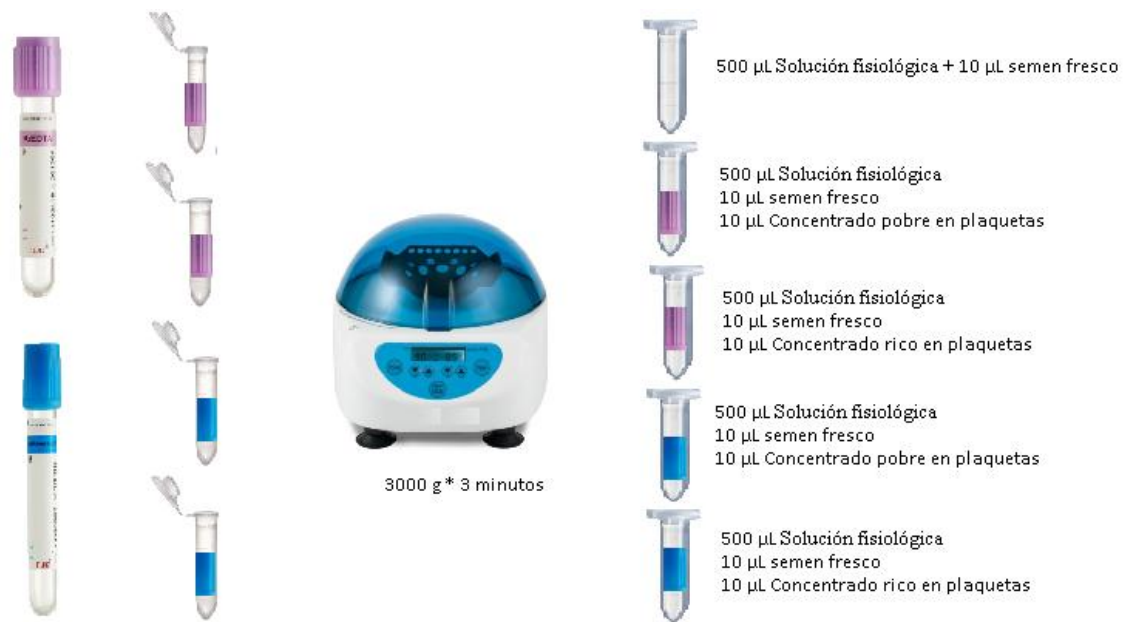


Figura 10. Representación de la metodología de trabajo.

Fuente: Autores, 2019

3.5 Análisis de laboratorio: semen fresco

Solo fueron evaluadas las muestras seminales con volumen, color, aspecto y pH de acuerdo a los patrones establecidos por Grajales, Tovio y Duica (2011).

3.5.1 Características macroscópicas.

3.5.1.2 Volumen, color, aspecto y pH.

Inmediatamente después de colectado el semen, las muestras fueron trasladadas al laboratorio seminal contiguo al sitio de recolección. Los tubos colectores graduados debidamente esterilizados, estaban dentro de un recipiente plástico protegidos de cambios bruscos de temperatura y de la incidencia de los rayos del sol. La lectura del volumen se hacía directamente en estos tubos de colección y la medida se expresaba en mililitros (mL).

En estos mismos recipientes colectores atemperados se observaba el color, aspecto y pH del eyaculado, descartando aquellas muestras con colores rojizos, pardos, grises o con presencia de flóculos de pus, así como las que tuvieran olores derivados de fluidos o excrementos del animal (fecales y/o pútridos), que denotaran contaminación de las muestras seminales. Las muestras con colores amarillentos eran olfateadas para descartar la contaminación con orina y su parecido con un pigmento inocuo (Riboflavina) que puede estar presentes en eyaculados de pequeños rumiantes, proveniente de las glándulas vesiculares (Madrid-Bury, 2004).

Para la determinación del pH se tomaba una pequeña alícuota con una micropipeta automatizada y se ponía en contacto con el bulbo del medidor de pH (HI8521, Hanna, Colombia) que brindaba una estimación de pH con exactitud. Todas las muestras seminales recién colectadas se mantuvieron en valores cercanos a la neutralidad entre 6,8 y 7,8. Era sumamente importante realizar esta prueba lo más próximo a la obtención del eyaculado (menor a cinco minutos) para

evitar el sesgo de cambios en el pH producto del consumo de energía de los movimientos espermáticos en el baño de maría termoestable a 38°C (Rubio-Guillen, 2017).

Inmediatamente se diluida las muestras a 1:400 en solución fisiológica, por la alta concentración espermática, sin esta dilución sería imposible evaluar las muestras en láminas portaobjetos.

3.5.2 Características microscópicas.

3.5.2.1 Motilidad espermática.

La motilidad del semen fresco fue evaluada subjetivamente en un microscopio de campo oscuro (Olimpus, BH2®, Japón). También se valoró más objetivamente con el uso de un software computarizado (ISAS®, V1.2, Proiser, Valencia, España), mediante la observación de dos (2) alícuotas de semen en varios campos con la cámara Sperm Track-20® (Proiser, Valencia, España).

Subjetivamente, se valoró la motilidad masal (MM) y la individual progresiva (MIP) con aumento 100X y 400X, respectivamente, también se estimó visualmente el vigor de movimiento de estas.

3.5.2.2 Concentración Espermática.

La concentración se determinó en semen fresco con un fotómetro digital (DVM, Rapid TEST II, Sperm Concentration Analyzer®, MAI, USA). Se colocaba 5 µL de semen puro (recién colectado y sin diluir) en un receptáculo especial del aparato y este expresaba la lectura automáticamente en millones de espermatozoides (10^6) por mL. En caso de esta especie evaluada, las lecturas fueron reflejadas en notación científica de (10^9) para arrojar cuentas de mil millones de espermatozoides por mL de semen eyaculado, debido a la alta concentración espermática de

estos ejemplares. Se tomaron tres lecturas de la muestra para evitar variaciones y se multiplicó por 5 para lograr la concentración verdadera de espermatozoides.

3.5.2.3 Vitalidad espermática.

Esta prueba se realizó colocando una gota de 10 μL de semen fresco diluido (1:400) en un portaobjeto atemperado a 38°C, incluyendo inmediatamente sobre esta gota de semen, 10 μL del colorante supravital eosina-nigrosina (EN); al cabo de 30 segundos se homogeniza suavemente la gota de semen con la gota del colorante y se hace un extendido fino (frotis), esperando unos minutos a que se seque. Los frotis se observaban en el microscopio óptico con el objetivo de inmersión de 100X (amplificación de 1000X), cuantificando un total de 100 espermatozoides con el fin de valorar la vitalidad espermática.

Al valorar esta vitalidad minuciosamente, se hacía énfasis en los espermatozoides muertos con membranas plasmáticas permeables que se teñían, y sus cabezas se observaban de color rosado; los vivos en cambio, tendrían sus membranas plasmáticas intactas, no permeables y no permitían el paso del colorante observándose de color claro blanco. La colorante nigrosina era de suma importancia para el contraste necesario en la identificación de los espermatozoides vivos, ya que los espermatozoides muertos por su eosinofilia supravital eran fácilmente identificados hasta utilizando el objetivo de 40X. El resultado final se expresaba en porcentaje (%) de vitalidad reflejando los vivos y muertos.

3.5.2.3 Anormalidades morfológicas.

Con el mismo frotis hecho para valorar la vitalidad espermática se cuantificaron las morfoanomalías de las muestras seminales recién colectadas, para esto, en las muestras coloreadas, secas y fijadas con EN se colocaba una gota de aceite de inmersión y con el objetivo de inmersión (100x) del microscopio óptico se cuantificaban 100 espermatozoides. Las células

fueron clasificados según su apariencia en normales (apariencia normal) y anormales, (con presencia de morfoanomalías) y expresados en porcentaje (%) de espermatozoides anormales. Estos últimos: defectos de cabeza (número, tamaño y apariencia), defectos de la pieza intermedia (ubicación y apariencia), anormalidades en el flagelo (número, forma y tamaño), así como signos de inmadurez en forma de presencia de gota citoplasmática proximal (GCP) y distal (GCD).

3.5.2.4 Evaluación del acrosoma.

Para visualizar su apariencia se utilizó una técnica sencilla que permite identificar la silueta del acrosoma al usar un microscopio de luz a 1000x de aumento con ayuda de aceite de inmersión. La tinción EN puede usarse para valorar la parte apical del acrosoma en espermatozoides cuyo tamaño así lo permita como es el de toros (Rubio-Guillén et al., 2007), cerdos (Quintero-Moreno, 2003), ovinos (Rubio-Guillén, 2017) y caprinos (Hernández-Corredor, 2017),

Esta prueba fue realizada al semen fresco. En los frotis teñidos de EN se observaba presencia del acrosoma intacto (NAR, *Normal Apical Ridge*) y cuando el mismo estuviese ausente, o alterado se contabilizaba como acrosoma alterado DAR (*Damage Apical Ridge*), y cuando estaba ausente era cuantificado como MAR (*Missing Apical Ridge*). Como fue descrito anteriormente, por el tamaño de la célula espermática es fácilmente evidenciable la presencia o ausencia de esta importante estructura (Rubio-Guillén et al., 2009). El resultado final de NAR, DAR y MAR se expresaba en porcentaje (%).

3.5.3 Pruebas de funcionalidad espermática.

3.5.3.1 Test de Endosmosis (HOST).

El HOST en las células espermáticas de éstos ovinos se realizó sometiendo una muestra de semen fresco a un medio hiposmótico de 154 mOsm/L, la incubación durante 30 minutos, en tubos eppendorf de 2 mL donde se agregaban 100 µL de la solución hiposmótica y de 10 µL de semen, atemperando en un baño maría termoestable a 38°C. Transcurrido este tiempo de incubación, se fijan los espermatozoides con la tinción EN sobre una lámina portaobjeto, se evaluaba la muestra, utilizando un microscopio óptico con el objetivo de inmersión de 100X. Se contaron los espermatozoides hasta un total de 100 células, los flagelos flectados, enrollados o reaccionados a la prueba eran todos aquellos que alguna porción de la cola espermática se enrollaba parcial, total o inclusive tenuemente (Torsión helicoidal del flagelo). Al observar minuciosamente cada muestra resultaba muy importante visualizar adecuadamente la parte terminal del flagelo por la reacción puede ser tan poco perceptible, que sea solo evidente en esa pequeña parte del espermatozoide. Razón por lo cual, esta prueba es leída a diferencia de la prueba inicial de Jeyendran (1984), con una amplificación de 1000X de aumento.

3.5.3.2 Test Azul de anilina (TAA).

Se extienden 10 µL del semen fresco sobre un portaobjetos, se deja secar un minuto al aire y se fija con metanol al 4 % por 5 minutos, luego se sumerge en una solución del 5 % de azul de anilina diluido en ácido acético al 4% (pH 3.5). En el microscopio óptico, directamente sobre el frotis teñido y utilizando el objetivo de inmersión (100X), se contaban 100 espermatozoides y se observaron las células espermáticas con azul oscuro como espermatozoides con daño en el ADN.

3.5.3.3 Evaluación computarizada del semen CASA y ASMA.

3.5.3.3.1 Análisis de la motilidad espermática mediante programa computarizado (CASA).

El análisis se realizaba mediante alícuotas seminales previamente diluidas 1:400 (semen recién colectado) luego se tomaba 5 μL y se colocaban en el Sperm Track 20®. Posteriormente, se capturaban los espermatozoides en movimiento en un microscopio de contraste de fases a 200X de aumento con el fin de guardarlos como imágenes digitalizadas. El lente del colimador en contraste de fases positivo era ajustado en la posición ph2. Los parámetros para evaluar fueron: Velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m}/\text{sg}$), Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m}/\text{sg}$), Velocidad media (VAP, $\mu\text{m}/\text{sg}$), Índice de linealidad (LIN, %), Índice de rectitud (STR, %), Índice de oscilación (WOB, %), Frecuencia de batida de la cabeza (BCF, Hz). El sistema CASA a utilizar está basado en el análisis de 31 imágenes fotografiadas y digitalizadas, tomadas en un lapso de 0,64 segundos, lo cual implica un tiempo de captura de imágenes de 40 milisegundos. Por cada muestra de semen evaluado serán tomados como mínimo 5 fotografías, contabilizándose como mínimo 200 espermatozoides por cada ovino.

3.5.3.3.2 Análisis computarizado de la morfología del espermatozoide (ASMA)

Para el semen fresco, las muestras fueron teñidas y fijadas con la tinción de Diff quick® (Jorgensen laboratories, Loveland CO, 80538), utilizando la metodología descrita por Hidalgo et al., (2006). En el portaobjetos se colocó 10 μL de semen fresco, luego se colocaron en la platina de calentamiento a 38 °C por 20 minutos, se toma el portaobjetos y se hacen cinco (5) inmersiones (rápidas) en la tinción fijadora (#1), seis (6) inmersiones (rápidas) en la solución de tinción (#2), siete (7) inmersiones (rápidas) en la tinción de contraste (#3), en esta última parte se hace un lavado con agua estéril, hasta que el portaobjetos de un color rosado transparente, a los 30 minutos de secado se almacenan para su posterior evaluación morfológicas .



Figura 11. Capturas del software ISAS V 1.2, células espermáticas teñidas con Diff quick®.

Fuente: Autores, 2019.

Las dimensiones morfométricas para el largo (L , μm), ancho (W , μm), área (A , μm^2) y perímetro (P , μm) fueron tomadas de 200 imágenes, tal como se describe en trabajos previos Quintero-Moreno et al., (2009) y Hernández-Corredor et al., (2014). Este número de imágenes asegura un mínimo de 100 medidas de cabeza espermática por muestra excluyendo previamente aquellas medidas de cabeza inapropiadas (Figura 11). Las células espermáticas se seleccionarán al azar para el análisis morfométrico. Las medidas de cada cabeza espermática de cada ovino fueron guardadas en una base de datos Excel® (Microsoft®, Redmond, Washington, USA) compatible con el software, para posteriormente exportar la información al "*Statistical Analysis System*" (SAS) para el análisis estadístico.

3.6 Metodología estadística

Todos los datos grabados fueron analizados por SAS/ *Statistical Analysis System* software 8.2, para Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. USA. 2002). La Normalidad de los datos fue evaluada por el estadístico de Shapiro-Wilk (W), incluido en el procedimiento UNIVARIADO. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para cuantificar el efecto del anticoagulante (citrato de sodio vs. EDTA), y el tratamiento (NaCl 0,9% /Concentrado pobre/concentrado rico) sobre las

variables dependientes evaluadas de calidad seminal (vitalidad, motilidad, integridad del acrosoma, HOST y Daño ADN,) siendo expresados en valores porcentuales (%), y evaluadas a través del Modelo Lineal General del Análisis de la Varianza (Proc GLM) en varios eyaculados de cada ovejo. Cuando se encontraron diferencias entre las medias, se cuantifico el efecto mediante el procedimiento de Diferencias Mínima Significativa (DMS) y la prueba Tukey con un nivel de significancia mínimo exigido fue de $P < 0.05$. El modelo matemático utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + C_j + TC_{ij} + \xi_{ijk} \text{ donde:}$$

Y_{ijk} = Respuesta traducida en : Variables de calidad que describen los espermatozoides

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento (i= citrato de sodio/EDTA)

C_j = Efecto del j-ésimo grupo (NaCl 0,9% /Concentrado pobre/concentrado rico)

TC_{ij} = Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento con el j-ésimo grupo

ξ_{ijk} = Error experimental

Se realizó sobre una población de 10680 células espermáticas para motilidad, para morfometría se usaron 3613 observaciones, para las demás variables se tomaron 4800 espermatozoides.

CAPÍTULO IV.

4.1 Resultados y discusión

En la Tabla 4. Se observa el total de las muestras analizadas, cuatro muestras de semen fresco por cada ovino. Estos dos (2) animales presentaron un promedio de motilidad individual progresiva, medida subjetivamente, para el semen fresco de 80 % (dato no mostrado en tabla) y el porcentaje de motilidad masal (1-5) de 4 (dato no mostrado en tabla).

Los machos evaluados (2) en la investigación, no presentaron problemas en el protocolo de recolección seminal, Grajales, Tovia y Duica, (2011). Cuando alguno rechazaba la monta con el hecho de observar a otro macho montando, en el siguiente intento daban la muestra seminal sin problema. La monta y colección duró entre 2 y 5 minutos, al igual que lo reportado por Pineda (2002). La recolecta seminal fue realizada con vagina artificial atemperada, aunque con electroeyaculador el volumen espermático es mayor, la calidad espermática es menor (Hernández-Corredor et al., 2014). El volumen del eyaculado ($0,87 \pm 0,02$ mL) y la concentración espermática en fresco ($2,96 \pm 0,19 \times 10^9$ spz/mL) estuvieron en los rangos promedios según lo reportado por Hafez y Hafez (2005); Grajales, Tovia y Duica, (2011) y Rubio-Guillen, (2017). Se observó que no existieron diferencias significativas sobre los parámetros de evaluación de la calidad espermática ($P \geq 0,05$), resaltando que por encima del 80% de normozoospermia se consiguen las mejores tasas de fertilidad en campo cuando se hacen análisis retrospectivos de machos rumiantes usados comúnmente en monta natural y en inseminación artificial (Attia et al., 2016). El porcentaje de gotas citoplasmáticas no afecta la tasa de fertilidad en rumiantes a menos que se encuentren niveles excesivamente altos por patologías presentes (Rubio-Guillen, 2017). La

morfología espermática está claramente asociada con la fertilidad en rumiantes (González et al., 2008).

Tabla 4.

Características generales ($\mu \pm EE$) en el semen fresco y los diferentes tratamiento en ovinos tropicales (Fuente: Autores, 2019)

Características	TRATAMIENTOS					
	Fresco	NaCl	CpC	CrC	CpE	CrE
Volumen (mL)	0,87±0,02	-	-	-	-	-
Conc.(spz$\times 10^9$/mL)	2,96±0,19	-	-	-	-	-
pH	7,68±0,05	-	-	-	-	-
Vitalidad (%)	98,63±0,63 ^a	97,40±0,81 ^a	96,00±1,14 ^a	96,20±1,31 ^a	96,83±1,19 ^a	96,33±0,84 ^a
DAR (%)	3,87±0,54 ^a	4,80±0,80 ^a	5,00±1,00 ^a	5,60±1,07 ^a	4,66±0,88 ^a	5,16±1,04 ^a
MAR (%)	10,50±0,88 ^a	11,20±1,11 ^a	9,80±1,65 ^a	10,00±2,07 ^a	8,10±1,01 ^a	10,33±1,33 ^a
NAR (%)	85,62±1,30 ^a	84,00±1,70 ^b	85,20±2,41 ^a	84,40±2,15 ^a	87,16±1,77 ^a	84,50±2,20 ^c
Gotas citoplasmática (%)	2,5±1,5	-	1,0	1,0	1,0	-
Cabeza Anormal (%)	6,85±0,93 ^a	5,00±1,41 ^a	6,40±1,02 ^a	5,40±1,12 ^a	7,00±1,08 ^a	6,80±1,24 ^a
HOST (%)	81,00±2,03 ^a	79,40±3,21 ^a	80,60±2,95 ^a	79,80±3,00 ^a	78,66±2,82 ^a	80,66±2,69 ^a
Integridad de la cromatina (%)	97,65±1,33 ^a	96,78±2,17 ^a	95,86±3,46 ^a	96,44±2,61 ^a	97,18±1,22 ^a	97,56±2,55 ^a

NaCl: Cloruro de Sodio; CpC: concentrado pobre en plaquetas obtenido en citrato de sodio; CrC: concentrado rico en plaquetas obtenido con citrato de sodio; CpE: concentrado pobre en plaquetas obtenido con EDTA; CrE: concentrado rico en plaquetas obtenido con EDTA; DAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. MAR (%): porcentaje de acrosomas reaccionados o alterados. NAR (%): porcentaje de acrosomas no reaccionados o alterados. Total anormalidades (%): incluye las morfoanomalías de la cabeza y flagelo espermático.. HOST (%): espermatozoides positivos al test de endósmosis. (a,a): letras iguales en las filas no denotan diferencias estadísticas significativas ($P \geq 0,05$).

En ésta investigación las fases del procesamiento seminal (fresco) enfrenta a las células espermáticas a unas concentraciones de CAP con diferentes osmolaridades (no medidas). Este cambio conlleva a un detrimento bioquímico, funcional y ultraestructural de las membranas de los espermatozoides. Montoya, (2016) concluye, que el medio para preservación seminal, tiene como objetivo inhibir la actividad metabólica del semen, garantizando su vitalidad y función a través del tiempo, logrando conservar las características seminales del semen recién eyaculado.

Los daños estructurales que ocurren durante la preservación seminal una vez colectado el semen los explica Salamon y Maxwell, (1995), éstos pueden ocurrir como cambios bioquímicos y/o pérdidas de sustancias vitales como: aminoácidos, proteínas, aumento en la concentración de sodio, disminución del potasio, baja en la actividad de la fosfatasa, inactivación de la hialuronidasa y transaminasa glutámica oxalacética (TGO), reducción de la síntesis de ATP y ADP así como un daño en la actividad proteolítica acrosomal (Guerra et al., 2004). Teniendo en cuenta, que la estructura de la membrana varía de acuerdo a la región espermática así como sus propiedades físicas, químicas y sus regiones acrosomal, post acrosomal, pieza principal y pieza intermedia (Eddy, 2007). Daños no evidentes en la investigación.

Sin embargo, las múltiples variaciones de osmolaridad y oxidación determinan cambios en la estructura de la membrana plasmática haciéndola un mosaico de gel y fluidos en diferentes fases y medios, generando una barrera intramembranosa que impiden la difusión libre de iones, por consiguiente se ve afectada la movilidad, como a su vez algunos parámetros morfológicos de las células espermática por la oxidación, como por ejemplo el aumento del porcentaje espermatozoides reaccionados en la prueba de HOST (Valcarcel et al., 1994).

A la evaluación de la integridad de la membrana acrosomal (NAR), para éste ensayo se encontraron valores parecidos a los reportados por Jiménez-Rabadán (2012) y Estes et al.,

(2015). La pérdida de la membrana que se observa en los espermatozoides concuerda con lo reportado por Pursel et al., (1972) y Osorio-Serna et al., (2007), concluyendo que es el resultado del estrés oxidativo producido por el tiempo desde la colecta hasta la evaluación, sin un medio diluyente para protección y alimentación de las células espermáticas, afectando la membrana espermática, bien sea por el separación de la fase lipídica de la membrana, el daño irreversible de las proteínas de la misma y los radicales libres que se forman (Gadea, 2005; Pareja, 2016).

El sistema CASA, al permitir determinar la trayectoria individual de las células espermáticas, puede determinar el estado fisiológico de cada espermatozoide de acuerdo con sus características de velocidad y progresividad (Quintero-Moreno et al., 2003, Hernández-Corredor et al., 2013).

Alcaraz (2013) explica que las tres variables de velocidad que se determinan a través del CASA son los principales parámetros cinemáticos relacionados con la fecundación. Del mismo modo autores como Holt et al., (1997) en cerdos; Silva y Gadella (2006) en perros, demostraron que altas velocidades son puntos de referencia para la fecundación *in vivo* e *in vitro*. Dorado et al., (2009) en caprinos concluyeron que los parámetros de velocidad (VCL, VAP) son predictores del potencial de resistencia al proceso de congelación. Sin embargo, Gillan et al., (2005) definieron que para toros el VSL es el parámetro que se relaciona con fecundación.

Las discrepancias entre los tratamientos (NaCl, CpC,) para las variables de movilidad espermática CASA se debe a la sensibilidad de los espermatozoides a los choques osmóticos (Watson, 2000; Osorio, 2013). Zhu y Liu (2000) y Blesbois (2007), describen que en las células espermáticas hay un marcado deterioro en la membrana plasmática y acrosomal; autores como Fraczek y Kurpisz (2005) reportaron el daño a nivel de la desfragmentación del ADN y el daño mitocondrial, teniendo en cuenta lo anterior, se propone que la disminución de la movilidad

individual de las células espermáticas sucedió cuando se evalúa el semen después de pasado el tiempo de colecta (más de cinco minutos).

En la investigación, las velocidades espermáticas en los diferentes tratamientos mostraron diferencias significativas entre los procesos ($P \leq 0,01$) VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF. Debido a que la supervivencia de los espermatozoides, la movilidad y la fecundidad disminuyen después del proceso de colecta, las características del semen fresco (SF) a menudo se correlacionan pobremente con la calidad del macho (Verstegen et al., 2002). En contraste, una correlación entre ciertas variables de movilidad, anormalidades e integridad del acrosoma pueden predecir la capacidad fecundante después de la criopreservación (Dorado et al., 2009). Sin embargo, Evans y Maxwell, (1990) y Leboeuf et al., (2000) propusieron que la morfología espermática es un criterio para la selección de los eyaculados fértiles. Eyaculados con un porcentaje bajo de anormalidades morfológicas en semen fresco, tienen en promedio, los mejores valores de movilidad y velocidad si se evalúan después de la descongelación (Hidalgo et al., 2007; Vásquez et al., 2013; Rahmatzadeh et al., 2017 y Ledesma et al., 2017). Sin embargo, Muñio-Otero et al., (2007), concluyeron que los espermatozoides más rápidos y progresivos resisten mejor el efecto dañino de la criopreservación.

Teniendo en cuenta lo expuesto con anterioridad, en la investigación se observa como al agregar 10 μ L de CAP rico al semen (Tabla 5) y que se tomó con EDTA como anticoagulante, las velocidades espermáticas aumentan (VCL, VAP, VSL), entre un 6,18% y un 12,21 % comparado con las velocidades tomadas en el SF (Tabla 6). Puesto que la movilidad espermática depende de factores endógenos y exógenos, se tiene importancia en la investigación de Vera-Muñoz (2008) donde afirma que, la aparición de esta motilidad está asociada a un incremento intracelular del AMP cíclico y de proteínas-kinasas dependientes de AMP cíclico y a la

disminución de Ca^{++} y de calmodulina. La movilidad progresiva está asociada a un aumento de la carnitina intracelular en los espermatozoides. En la investigación se planteó que, con el uso de CAP, que contiene serotonina (Metclaf et al., 2012) podría inducir el aumento en los valores VCL, logrando velocidades iguales al estudio de Jiménez-Trejos et al. (2016), en semen humano, que usaron serotonina en altas concentraciones, mejorando VCL, mientras que en concentraciones bajas de serotonina aumenta VSL como VAP sin embargo, no afectan la VCL. (VCL: comprende solo el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide sin tener en cuenta la velocidad de movimiento de la pieza principal, como hacen VSL y VAP).

Rubio-Guillen (2017), determina que no se conocen exactamente los factores que influyen en la motilidad espermática, se sabe que son de origen epididimario y que podrían disparar fosforilaciones de proteínas dependientes de AMP cíclico. Por lo tanto, también se activa el sistema adenilato ciclasa. Estas secreciones epididimarias contienen, en el caso del morueco, una proteína de 66 kD dependiente de andrógenos e involucrada en la adquisición de la capacidad de unión con la ZP3 (Dacheux y Dacheux, 2001), tomando en cuenta que durante esta capacitación, las proteínas dentro de la membrana del espermatozoide migran, gracias a la pérdida de colesterol intramembrana, formando así dominios con o sin estas últimas. En las zonas donde no hay proteínas se fusionará la MP y la membrana acrosomal externa. Esa fusión inicia el proceso de exocitosis del contenido acrosomal también llamado capacitación espermática (Kraus et al., 2005).

Moura y Memili (2016), determinan que la enzima convertidora de angiotensina (ECA) es un componente seminal relacionado con el sistema de las calicreinas (Hohlbrugger et al., 1984). La ECA cataliza la formación de angiotensina II y protege a los receptores espermáticos, intensificando los eventos relacionados con la motilidad (Vinson et al., 1996). En el morueco la

actividad de la ECA en el plasma seminal tiene una correlación positiva con la concentración espermática y la fertilidad (Métayer et al., 2001; Gatti et al., 2004). En el plasma seminal bovino la ECA inhibe el decreciente número de espermatozoides con motilidad progresiva e inhabilita la reacción acrosomal después de la capacitación *in vitro* (Costa y Thundathil, 2012)

Para el parámetro índice de linealidad (LIN) según el estudio de Cox et al. (2006) determinaron que existe una alta correlación con los demás parámetros de motilidad evaluados por el sistema CASA para semen ovino, demostrando que valores mayores a 50 % en espermatozoides evaluados *In Vitro* presentan una excelente migración. Adicionalmente, parámetros como LIN y ALH parecen ser indicadores de la hiperactivación de los espermatozoides (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Sin embargo, para Quintero-Moreno et al. (2003) un valor por debajo del 50% de LIN está correlacionado a la hiperactivación espermática. En ésta investigación los tratamientos de CpC (47,21%), NaCl (50,48%) y CrC (51,53%) mostraron signos de hiperactivación, pudiendo ser los ROS los encargados de generar estos índices (Tabla 5).

Bravo et al. (2011), concluyen que el índice de rectitud (STR) define los espermatozoides que son considerados progresivos cuando el valor es superior a 80% (solo el SF y CrE mostraron estos valores).

Los valores de linealidad y oscilación (índices de desplazamiento frontal) también presentaron un aumento en sus porcentajes motivados al efecto del CAP ($P < 0,001$). Esto evidencia un cambio notorio en el patrón de movimiento espermático que altera la progresividad lineal de todos los espermatozoides. Las trayectorias fueron más progresivas tras la adición del CAP (mayor LIN) un 4,30% superior con el CrE (Tabla 6).

Tabla 5.

Media y error estándar de los descriptores de motilidad espermática según tratamiento realizado a los ovinos evaluados (Fuente: Autores, 2019)

Descriptor	TRATAMIENTO					
	Fresco	NaCl	CpC	CrC	CpE	CrE
VCL	118,04±1,39 ^b	112,92±1,44 ^c	106,50±0,93 ^d	113,56±1,26 ^{bc}	113,62±1,12 ^{bc}	125,34±1,18 ^a
VSL	65,97±1,30 ^b	58,97±1,19 ^{cd}	50,97±0,71 ^d	59,92±1,03 ^{bc}	62,98±0,98 ^{bc}	71,62±1,12 ^a
VAP	74,10±1,17 ^b	71,12±1,18 ^b	65,57±0,71 ^c	74,16±1,01 ^b	74,17±0,95 ^b	83,15±1,04 ^a
LIN	53,46±0,07 ^b	50,48±0,06 ^c	47,21±0,04 ^d	51,52±0,05 ^{bc}	52,99±0,05 ^b	55,76±0,06 ^a
STR	82,33±0,06 ^a	78,25±0,06 ^{cd}	74,13±0,04 ^e	76,82±0,05 ^{de}	79,79±0,04 ^{bc}	81,34±0,05 ^{ab}
WOB	61,19±0,05 ^c	61,33±0,05 ^c	60,66±0,03 ^c	63,70±0,04 ^{ab}	63,06±0,04 ^b	64,89±0,04 ^a
ALH	3,95±0,04 ^a	3,98±0,04 ^a	3,91±0,03 ^a	3,88±0,04 ^b	3,88±0,03 ^c	4,01±0,01 ^a
BCF	7,47±0,10 ^a	6,58±0,09 ^b	5,84±0,05 ^d	6,26±0,06 ^c	6,49±0,07 ^{bc}	7,29±0,08 ^a

VCL: Velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$), VSL= velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$), VAP= velocidad promedio ($\mu\text{m/s}$), LIN= índice de linealidad (%), STR= índice de rectitud (%), WOB= índice de oscilación (%), ALH= desplazamiento lateral de la cabeza (μm) BCF= Frecuencia de la Batida de la Cabeza espermática (Hz). (a,b,c): letras diferentes en las filas denotan diferencias estadísticas significativas ($P<0,001$).

Existió una disminución de la BCF (SF: 7,47 Hz vs. CrE: 7,29) del 2.4% entre la evaluación en fresco y el tratamiento CrE, para la evaluación del parámetro ALH (SF: 3,95 $\mu\text{m/s}$ vs. CrE: 4,01 $\mu\text{m/s}$) existió un incremento (1,52%). El parámetro ALH es un importante indicativo de frecuencia de rotación celular como probable propulsor de movimiento sobre todo si se disponen las muestras seminales en desplazamiento a través de moco cervical (Kumar y Kant, 2015). Los espermatozoides mostraron una ALH más alta, una propiedad que refleja la capacidad de penetrar

el moco en el cuello uterino y de unirse con el ovocito (Verstegen et al., 2002; Kosdrowski et al., 2007).

Tabla 6.

Porcentaje de ganancia o pérdida de los parámetros evaluados en la motilidad espermática según tratamiento realizado a los ovinos evaluados (Fuente: Autores, 2019)

Descriptor	TRATAMIENTO					
	Fresco	NaCl (%)	CpC(%)	CrC(%)	CpE(%)	CrE(%)
VCL	118,04	-4,34	-9,78	-3,80	-3,74	6,18
VSL	65,97	-10,61	-22,74	-9,17	-4,53	8,56
VAP	74,10	-4,02	-11,51	0,08	0,09	12,21
LIN	53,46	-5,57	-11,69	-3,63	-0,88	4,30
STR	82,33	-4,96	-9,96	-6,69	-3,09	-1,20
WOB	61,19	0,23	-0,87	4,10	3,06	6,05
ALH	3,95	0,76	-1,01	-1,77	-1,77	1,52
BCF	7,47	-11,91	-21,82	-16,20	-13,12	-2,41

VCL: Velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$), VSL= velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$), VAP= velocidad promedio ($\mu\text{m/s}$), LIN= índice de linealidad (%), STR= índice de rectitud (%), WOB= índice de oscilación (%), ALH= desplazamiento lateral de la cabeza (μm) BCF= Frecuencia de la Batida de la Cabeza espermática (Hz).

Según Miki (2007), existe una creciente evidencia de que el ATP soporta la motilidad del esperma, éste es generado por vía de la glucólisis, que tiene lugar a lo largo de toda la pieza principal (Mukai y Okuno 2004). Se ha demostrado que la frecuencia de batido de los flagelos es proporcional a la tasa de hidrólisis de ATP por la dineína cuando la onda se mantiene constante (Okuno y Brokaw 1979). La serotonina mejora el flujo glucolítico a través de la activación de la

6-fosfofructosa-1-quinasa (PFK), que se produce a través de la modulación de la unión de la enzima al citoesqueleto de la membrana (Assouline-Cohen et al. 1998). Además, la actividad de PFK se correlaciona con una vía glucolítica completa en el músculo (Kemp y Foe 1993). La serotonina aumenta el consumo de glucosa en el músculo esquelético y sugiere que esta neurohormona puede regular el metabolismo de la energía celular (Coelho et al. 2007); por lo tanto, en el espermatozoide, es probable que la serotonina juegue un papel similar.

En el estudio de Jiménez-Trejos et al. (2016) al aplicar niveles altos de serotonina, se induce movimientos de la cabeza del espermatozoide rápidos, mientras que en concentraciones más bajas aumentó la linealidad del desplazamiento de espermatozoides, debido a que la serotonina aumenta el nivel de fosforilación de tirosina, lo que indica que esta indoleamina induce hiperfosforilación de las dineínas, en la pieza intermedia, resultando en un desplazamiento no fisiológico del espermatozoide (Bandivdekar et al. 1992, Stephens y Prior 1992). Sin embargo, los efectos de la serotonina en los diferentes parámetros de la motilidad del espermatozoide, a diferentes concentraciones, sugieren que pueden participar modulando el desplazamiento del espermatozoide a diferentes niveles moleculares, aunque, este aspecto requiere más investigación, como se contrasta con las investigaciones de Safarinejad, (2008).

Investigadores como Hernández y Chirinos (2018) explican que las células endometriales del útero también secretan interleucina-6 (IL-6), que es un mediador de la respuesta inflamatoria que aumenta durante el período periovulatorio. (Tabibzadeh y Sun, 1992). IL-6 induce la capacitación espermática mediante el aumento de la fosforilación de la proteína tirosina y mejora el ionóforo espontáneo inducido por el calcio. Además, investigaciones recientes indican una amplia presencia de factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) en el útero y el oviducto de la ratona,

esta proteína es capaz de aumentar la motilidad espermática, niveles de calcio intracelular y pérdida acrosomal in vitro (Saucedo et al., 2018).

Tabla 7.

Media y error estándar de los descriptores de morfometría espermática según tratamiento realizado a los ovinos evaluados (Fuente: Autores, 2019)

Descriptor	TRATAMIENTO					
	Fresco	NaCl	CpC	CrC	CpE	CrE
Largo	9,44±0,06 ^c	9,40±0,01 ^c	9,74±0,03 ^b	9,75±0,05 ^b	9,83±0,12 ^a	9,94±0,08 ^a
Ancho	5,34±0,03 ^c	5,04±0,005 ^c	5,57±0,01 ^b	5,56±0,05 ^b	5,63±0,05 ^a	5,67±0,06 ^a
Área	43,84±0,46 ^c	39,66±0,07 ^d	45,75±0,63 ^b	46,74±0,31 ^b	46,91±0,79 ^b	48,64±0,36 ^a
perímetro	26,38±0,14 ^{cd}	25,35±0,04 ^d	26,98±0,04 ^c	27,48±0,13 ^{bc}	27,53±0,27 ^b	28,63±0,18 ^a

Los resultados son expresados en media aritmética ± error estándar para las muestras de semen analizadas de los ovinos. Letras iguales (a, a) no muestran diferencias significativas ($P \geq 0,05$), letras diferentes (a,b) muestran diferencias significativas ($P \leq 0,001$).

Las diferencias en el tamaño de la cabeza entre las células espermáticas en los diferentes tratamientos, se da porque los espermatozoides han modificado la función de la membrana y éstos habrán perdido o ganado parte de su contenido intracelular como resultado del cambio osmótico (Hernández-Corredor et al., 2018). Por lo tanto, explica el crecimiento excesivo de las células espermáticas frente a los cambios físico-químicos y de adaptación fisiológica de las células a los diferentes estresores de los componentes que le agregan en cada proceso. Cabe resaltar que el tratamiento de CrE y el CpE presentan mayores valores a los descritos en la muestra en fresco, teniendo en cuenta el papel que realiza el biofarmaco al ser incluido en el semen ovino.

La rehidratación progresiva de los espermatozoides sucede por los cambios de osmolaridad y temperatura, algunas veces puede llegar a causar daño acrosomal, éste cambio en la distribución de enzimas en las membranas o diferencias en la estructura del ADN, se pueden generar por los radicales libres (Marti et al., 2011, Buzón, 2013). Sin embargo, los parámetros de funcionalidad de las membranas y la integridad del ADN, no presentaron cambios en los valores normales o de referencia en el presente estudio.

Autores como Tuncer y col. (2013), concluyen que la posible reacción fisiológica de las células espermáticas al cambio en la morfología puede ser atribuida al estrés oxidativo (del medio), o a efectos del plasma seminal, que protege el espermatozoide en el proceso de manipulación.

Al comparar los datos obtenidos en la investigación con los presentados para ovinos en el trópico, no se observaron diferencias significativas según lo reporta Rubio-Guillen (2017); sin embargo, están por debajo de los datos presentados por Sepúlveda et al., (2018); esta diferencia puede ser atribuible a muchos factores, como la técnica de fijación utilizada, el procedimiento de tinción, la variación individual o el sistema de ASMA empleado; en tal sentido, la interpretación exacta de los resultados debería ser diferente cuando se utilizan tinciones nucleares o celulares.

CAPÍTULO V.

5.1 Conclusiones

Al comparar los descriptores de movilidad con los diferentes tratamientos, se evidenció el daño causado desde la toma de muestra, hasta la adición de NaCl y las demás inclusiones de concentrados autólogo de plaquetas, empezando con la movilidad que es el primer parámetro que se observó disminuido, producto del efecto deletéreo en el proceso fisiológico de formación de radicales libres de oxígeno y metabolitos de desecho de las células espermáticas, observando una pérdida gradual de la velocidad y linealidad de los espermatozoides. Es de resaltar, que en el tratamiento de concentrado rico centrifugado con EDTA (CrE), no sucede esta pérdida.

Durante la investigación la adición de concentrado autólogo de plaquetas rico centrifugado con EDTA (CrE), mejoró la motilidad espermática con respecto al semen fresco. Dicho proceso parece ser favorecido por la acción del factor de crecimiento fibroblástico que induce la motilidad espermática, la interleucina 6 (IL6) que induce la capacitación espermática por las vías de la inducción calcio ionóforo y el incremento de la proteína tirosina fosfatasa.

Al comparar los descriptores de morfometría espermática, el cambio de los valores de tamaño y forma en los diferentes tratamientos explica el cambio de las membranas espermáticas, la injuria del paso de un medio a otro y el tiempo de adaptación al mismo, la temperatura sobre las membranas y los fluidos internos de la célula espermática en ovinos.

Se puede concluir que el adicionar concentrado autólogo de plaquetas como biofármaco es altamente efectivo en la selección de espermatozoides rápidos, siendo más económica y sencilla que los gradientes de concentración.

5.2 Recomendaciones

Aundar más investigaciones sobre el tema del concentrado autólogo de plaquetas en el semen ovino.

Estudiar el efecto de la inclusión de concentrado autólogo de plaquetas en semen de las diferentes especies domésticas.

Realizar más ensayos con el aumento de las concentraciones de concentrado autólogo de plaquetas en PBS o en medios diluyentes comerciales.

Indagar la ocurrencia de la pérdida o reacción del acrosoma junto con la aplicación de la técnica que detecta la descondensación de la cromatina nuclear del espermatozoide en semen ovino, bajo la prueba de naranja de acridina.

Evaluar el efecto de la raza al incluir el concentrado autólogo de plaquetas y su implicación en el proceso de criopreservación; así como sus resultados en la integridad funcional y estructural de sus células espermáticas.

Continuar la evaluación morfométrica a través de citometria de flujo con los diferentes fluorocromos.

Evaluar a nivel de campo la inclusión de antioxidantes y su efecto en los descriptores de velocidad y de morfometría en los espermatozoides de ovinos en el trópico medio.

Referencias

- Aisen, E. 2004. Reproducción ovina y caprina. 1 ed. Intermédica, Buenos Aires, 216 p.
- Aitken, R., Wingate, J., De Iuliis, G., McLaughlin, E. 2007. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod*, 13:203-211
- Ahmad, M., Nasrullah, R. y Ahmad. N., 2015. Effect of cooling rate and equilibration time on pre-freeze and post-thaw survival of buck sperm. *Cryobiology* 70: 233–238.
- Alcalaz, L. 2013. Centrifugación coloidal del semen crioconservado de perro para la selección de espermatozoides. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. España. 57 p.
- Amann, R., y Waberski. D. 2014. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*. Jan 1;81(1):5-17.
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A. 2004. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*;91(1):4-15.
- Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I. 2006. New insights into novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*;24(5):227-34.
- Assouline-Cohen M, Ben-Porat H, Beitner R. Activation of membrane skeleton-bound phosphofructokinase in erythrocytes induced by serotonin. *Molecular Genetics and Metabolism*. 1998; 63:235–238.10.1006/mgme.1997.2673
- Attia, S., Katila, T., Andersson, M. 2016. The effect of sperm morphology and sire fertility on calving rate of Finnish Ayrshire AI bulls. *Reprod Domest Anim*, 51:54- 58.
- Bamba, K. 1988. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29: 1245-1251.

- Bandivdekar, A., Segal, S., Koide, S., 1992. Binding of 5-hydroxytryptamine analogs by isolated Spisula sperm membrane. *Invertebrate Reproduction & Development*. 21:43–46.10.1080/07924259.1992.9672218
- Barrios, B., Pérez, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T. y Cabrián, J., 2000. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biology of Reproduction*. 63, 1531–1537
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poult Sci J*. 63: 213-222.
- Bravo, J., Montanero, J., Calero, R. y Roy, T. 2011. Relación entre variables subjetivas e informatizadas del movimiento espermático del morueco. *Arch. Zootec*. 60 (232): 1087-1094.
- Bonilla-Gutiérrez, Aragón-Urrego, C., Aristizábal L. 2017. Protocolo para la obtención de un Concentrado Autólogo de Plaquetas en conejos: estudio piloto. *Rev Med Vet Zoot*. 64(1), enero – abril 24-31
- Buzón, A. 2013. Análisis cinético del espermatozoide del caballo bajo el sistema Sperm Class Analyzer. Universidad de Córdoba. Tesis Doctoral. 173 p.
- Carmona, J., Arguelles, D., Prades, M. 2008. Transforming growth factor beta-3 and nitric oxide levels in four autologous platelet concentrates and plasma derived from equine blood. *Arch Med Vet*;40:155-60.
- Carmona, J., López, C., Samudio, I. 2009. Autologous Platelet Concentrates as an Adjunctive Treatment for Chronic Laminitis in a Mare with Pituitary Pars Intermedia Dysfunction. *Journal of Equine Veterinary Science* 33; 191-195

- Castañeda-Vega, P., López-López, J., Chimenos-Küstner, E., Manzanares-Céspedes, C., Muñoz-Sánchez, J., Jané-Salas, E., Alvarez-López, J. Gimeno-Sanding, A. 2010. Estudio histomorfológico de la capacidad de regeneración ósea del plasma rico en plaquetas, médula ósea y fosfato tricálcico. Estudio experimental en cerdos “regeneración ósea en cirugía experimental en cerdos”. *Kiru*. 7(1): 25-33.
- Cancel, A.; Danelle, L.; Mendola, P. y Perreault, D. 2000. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. *Human reproduction* vol. 15 no. 6 pp 1322-1328
- Coelho, W., Costa, K., Sola-Penna, M. 2007. Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosinephosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Molecular Genetics and Metabolism*. 92:364–370.10.1016/j.ymgme.2007.07.010
- Costa, D. y Thundathil, J. 2012. Characterization and activity of angiotensin-converting enzyme in Holstein semen. *Anim Reprod Sci*, 133:35-42.
- Correa, J. y Zavos, P. 1994. The hipoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42: 351-360.
- Cox, F.; Alfaro, V., Montenegro, V.; Rodriguez-Martinez, H. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology* 66: 860–867.
- Chan, P., Tredway, D., Su, B., Corselle, J., Ren, S. 1991. Combined supravital stains and hypoosmotic swelling test. *Human Reprod* 6(8): 1115-1118.

- Chenoweth, P.F., J. Hopking, R. Spiter, R. Larsen. 1993. Guidelines for using the bull breeding Soundness Evaluation form. *Theriogenology Handbook B-10*. Hasting NE: 1-5.
- Chenoweth, P. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: Youngquist: *Current therapy in large animal Theriogenology*. Saunders, 1th Edition, 217 pp.
- Dacheux, F., Dacheux, J. 2001. L'épididyme et les glandes annexes. En: *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*. Coordonnateurs: Charles Thibault et Marieclaire Levasseur. Ellipses Édition Marketing, S.A. INRA. Paris, France. Chapitre 14: 455-468.
- Davis, R. y Katz, D. 1993. Operational standards for CASA instruments. *Journal of Andrology*, 41: 385-394
- De Paz P, Mata- Campuzano M, Tizado EJ, Alvarez M, Álvarez- Rodríguez M. 2011. The relationship between ram sperm head morphometry and fertility depends on the procedures of acquisition and analysis used. *Theriogenology* 76: 1313–25.
- Dominguez-Rebolledo, A., M., Fernández-Santos, A., Bisbal, J., Ros-Santaella, M., Carmona, F., Martínez-Pastor, y J., Garde. 2010. Suitability of novel antioxidants for protecting thawed spermatozoa from red deer. *Reprod Fertil Dev* doi: 10.1071/RD09197
- Dorado, J. 2003. Respuesta a la congelación-descongelación del esperma de macho cabrío. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria.
- Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A. y Rodríguez, I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Animal Reproduction Science* 112 : 150–157.

- Dorado J., M. Hidalgo; A. Muñoz y I. Rodríguez. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science* 121:115–123
- Eddy, E. 2007. The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc Reprod Fertil*, 65 : 45–62.
- Esteso, M., Rodríguez, E., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Pradiee, J., López-Sebastián, A. y Santiago-Moreno, J. 2015. Descriptive analysis of sperm head morphometry in Iberian ibex (*Capra pyrenaica*): optimum sampling procedure and staining methods using Sperm-Class Analyzer®. *Anim Reprod Sci.* Apr; 155:42-9.
- Evans,G., Maxwell, W., 1990. Salmon's Artificial. Insemination of Sheep and Goats, Butterworth, London, pp. 107-141.
- Fraczek M y Kurpisz M. 2005. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Hig Med Dosw* 2005;59:523-34.
- Franken, D., Franken, C., de la Guerre., H. de Villiers, A. 1999. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia*;31(6):361–6.
- Fonseca, J., Torres, C., Maffili, V., Borges, A., Santos, A., Rodrigues, M., Oliveira, R. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim. Reprod.* V.2, N. 2, 139-144.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63:431-444.
- García-Herreros, M., Aparicio, I., Baron, F., Garcia, J., Gil, M. 2006. Standardization of samples preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int J Androl*, v.29, p.553-563.

- García- Vázquez, F., Gadea, J., Matás, C., Holt, W. 2016. Importance of sperm morphology during spermtransport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology* 18: 1–7.
- Gatti, J., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., Dacheux, J. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci*, 82:321-339.
- Gillan, L., Evans, G., y Maxwell, W. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63, 445–457.
- Grajales, H., y Tovío N. 2010. Importancia de la oveja criolla colombiana como base genética en proyectos productivos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá
- Grajales, H., Tovio, N. y Duica, A. 2011. Guía técnica de producción ovina y caprina: Manejo y control reproductivo. Bogotá: Corpoica.
- González, D., Quintero-Moreno, A., Garde, J., Esteso, M., Fernández-Santos M., Rubio-Guillén, J., Mejía, W., González, Y., León, G., Bohórquez, R. 2008. Caracterización morfométrica de la cabeza del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado (resultados preliminares). *Revista Científica*, vol. XVIII, núm. 5, septiembre-octubre, pp. 570-577, Universidad del Zulia, Venezuela .
- Guerra, M., Evans G. y Maxwell, W. 2004. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrología (revisao de literatura). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 28: 187-195
- Hammerstedt, R. y Graham, K. 1992. Cryopreservation of poultry sperm the enigma of glycerol. *Cryobiology*; 29: 26–38.
- Hafez, E., y Hafez, B 2003. *Reproduction in farm animals*. 8th edition, Baltimore/USA. 509p.

- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Pérez, C., Sanz, J. 2004. Comparison of three staining procedures used for computerassisted buck sperm head morphometry analysis, *Reprod.Domest. Anim.* 39 (2004) 271, P35.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., 2006. Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66, 996-1003.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I. y Dorado, J. 2007. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Animal Reproduction Science.* 100: 61-72.
- Hernández-Corredor L., Nivia-Osuna A., Hernández-Villamizar D., Rubio-Parada J., Quintero-Moreno A. 2013. Evaluación de la movilidad espermática de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema CASA. *Revista Respuesta*, 2, 16-27.
- Hernández-Corredor, L., Dorado, J., Quintero-Moreno, A., Ortiz, I., Buzón A., Corzo, M., Hidalgo, M. 2014. Efecto de dos diluyentes a base de lecitina de soya sobre parámetros morfométricos en semen caprino. *Revista SENNOVA.* Vol. 1, No. 1. 30-43
- Hernández-Corredor, L., Quintero-Moreno, A. Camargo-Rodriguez, O., Rojas-López, M. 2017. Evaluación de la calidad espermática mediante citometría de flujo en semen caprino criopreservado con dos diluyentes. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXVII, N° 1, 35 – 43.*
- Hernández-Corredor, L., Camargo-Rodríguez, O., Silva-Torres, A., Montoya-Páez, J., Quintero-Moreno, A., 2018. Efectos de la criopreservación sobre las subpoblaciones espermáticas en caprinos. *Rev Inv Vet Perú*; 29(3): 882-893 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i3.14169>

- Hernández G. y Chirinos, M. 2019. Proteins from male and female reproductive tracts involved in sperm function regulation. *Zygote* page 1 of 12. doi: 10.1017/S096719941800062X
- Holt, C., Holt, W., More, H., Red, H. y Curnock, R. 1997. Objectively measured sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 18: 312-323.
- Holt, W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, Vol. 53, no.1, p. 47-58.
- Hohlbrugger, G., Pschorr, J., Dahlheim, H. 1984. Angiotensin I-converting enzyme in the ejaculate of fertile and infertile men. *Fertil Steril*, 41:324-325.
- Jeyendran, RS., HH. Van der Ven, M. Pérez-Peláez, BJ. Crabo, LJ. Zaneveld. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-228.
- Jiménez-Rabadán P., Morrell, J., Johannisson, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Alvaro-García, P., Pérez-Guzmán, M., Fernández-Santos, M., Garde, J., Soler, A. 2012. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen. *Anim Reprod Sci. Dec*; 136 (1-2):47-54.
- Jiménez-Trejo, F., Tapia-Rodríguez, M., Cerbón, M., Kuhn, D., Manjarrez-Gutiérrez, G., Mendoza-Rodríguez, A., Picazo, O. 2012. Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. *Reproduction*. December; 144(6): 677–685. doi:10.1530/REP-12-0145.
- Kemp, R. y Foe, L. 1993. Allosteric regulatory properties of muscle phosphofructokinase. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 57:147–154. 10.1007/BF00849191

- Kraus, M., Tichá, M., Zelezná, B. 2005. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. *J Reprod Immunol*, 65:33-46
- Kozdrowski, R., Dubiel, A., Bielas, W. y Dzieciół, M. 2007. Two Protocols of Cryopreservation of Goat Semen with the Use of Computer-Assisted Semen Analysis System. *Acta Vet. Brno*, 76: 601-604 doi:10.2754/avb200776040601
- Kumar, N. y Kant. A. 2015. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci*. 8(4): 191–196.
- Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62,113-141.
- Ledesma, A., Zalazar, L., Fernández-Alegre, E., Hozbor, F., Cesari, A. y Martínez-Pastor, F. 2017. Seminal Plasma Proteins Modify the Distribution of Sperm Subpopulations in Cryopreserved Semen of Rams With Lesser Fertility. *Anim Reprod Sci*. 184:44-50.
- Lossano, M., 2014. Evaluación funcional de espermatozoides porcinos preservados bajo condiciones de refrigeración mediante el diseño de diluyentes alternativos. Proyecto de Tesis maestría. Universidad del Zulia. 46 p.
- Madrid-Bury, N. 2003. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. Tomado: Reproducción Bovina. C. Gonzalez-Stagnaro (Ed.) Ediciones Astrodata SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Cap. XVI: 263-278.
- Madrid-Bury, N. 2004. Relación entre los métodos de valoración seminal in vitro y la fertilidad in vivo del semen descongelado de toros frisonos. Universidad Complutense de Madrid. División de Estudios de Postgrado. Facultad de Veterinaria. 164 p.

- Madrid-Bury, N., J. Pérez, S. Pérez-Garnelo, P. Moreira, B. Pintado, J. Gutiérrez-Adán. 2005. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 64: 232–241.
- Maroto-Morales , A. 2012. Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*). Relaciones con la fertilidad. En: Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM). 195 p.
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Alvarez-Rodriguez, M., Alvarez, M., Anel, L., y De Paz, P., 2010. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. *Reprod Dom Anim* 45 (Suppl. 2), 67–78.
- Marx, R.2001. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.*;10(4):225-8.
- Marx, R.2004. Platelet-rich plasma: evidence to support its use.*J Oral Maxillofac Surg*;62(4):489-96.
- Matos, D., Araújo A., Roberto, I. y Toniolli, R. 2008. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232.
- Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP, *et al.* Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(4):308-16.
- Métayer S, Dacheux F, Guérin Y, Dacheux JL, Gatti JL. 2001. Physiological and enzymatic properties of the ram epididymal soluble form of germinal angiotensin I-converting enzyme. *Biol Reprod*, 65:1332-1339.

- Metcalf, K., Mandelbaum, B., y McIlwraith, W. 2013. Application of Platelet-Rich Plasma to Disorders of the Knee Joint. *Cartilage* 4(4) 295– 312. DOI: 10.1177/1947603513487553
- Miki, K. 2007. Energy metabolism and sperm function. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 65:309–325.
- Montoya, J. 2016. Congelación de semen de asnos criollos colombianos empleando diferentes alternativas de suplementación en los diluyentes. Tesis maestría. Universidad Nacional de Colombia. 57 p.
- Moreno, R., Gaspar, M., Jiménez, J., Alonso, J., Villimar, A., López, P. 2015. Técnicas de obtención del plasma rico en plaquetas y su empleo en terapéutica osteoinductora, *Farm Hosp.*;39(3):130-136
- Moura, A. y Memili, E. 2016. Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. *Anim. Reprod.*, v.13, n.3, p.191-199. DOI: 10.21451/1984-3143-AR884
- Muñoz-Otero, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J., López, M., Fernández, A. y Peña, A. 2005. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, Vol. 101 (3), 175-191
- Muñoz-Otero, R., Fernández, M. y Peña, A. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18h. *Reprod Domest Anim*. 42(3): 305-311.
- Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biology of Reproduction*. 2004; 71:540–547. 10.1095/biolreprod.103.026054

- Nava-Trujillo, H., Hernández-Fernández, A., Quintero-Moreno, A. 2012. Integridad de la cromatina y forma de la Cabeza del espermatozoide de toro: Evaluación simultánea con la tinción de Azul de toluidina. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXII, N° 3*, 211 – 216.
- Okuno M, Brokaw CJ. Inhibition of movement of tritonmembranated sea-urchin sperm flagella by Mg^{2+} , ATP^{4-} , ADP and P1. *Journal of Cell Science*. 1979; 38:105–123.
- Osorio, C. 2013. Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, movilidad y morfología espermática en semen criopreservado de Búfalo. Tesis maestría. Universidad del Zulia. 106 p.
- Osorio-Serna, R., Giraldo, J., Mesa, H., Gómez-Londoño, G. Henao-Uribe, F. 2007. Evaluación de la integridad acrosómica en semen de verraco. *vet.zootec*. 1(1): 41-47 En: http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/Revista1_7.pdf.
- Pareja, A. 2016. Relación de la composición del plasma seminal con la criotolerancia espermática y el efecto de la suplementación con antioxidantes y el sistema de empaque sobre las características espermáticas de semen asnal criopreservado. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia, 219 p.
- Peña, A. y Linde-Forsberg, C. 2000. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 5: 859–875.
- Pineda, D. 2002. Biotecnología en la reproducción de animales domésticos. ISBN. 958-33-2425-6. UNARIÑO.
- Pursel, V., Jhonson, A., y Rampacek, B. 1972. Acrosome Morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science*. Vol 34: 2; 278- 283.
- Quinn, M. 2005. Platelet physiology. In: Quinn M, Fitzgerald D, Cox D, eds. *Platelet Function: Assessment, Diagnosis, and Treatment*. Totowa,NJ: Humana Press, Inc.,1–15.

- Quintero-Moreno, A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. (Tesis Doctoral). 164 pp.
- Quintero-Moreno A., González, D., Garde, J., Esteso, M., Fernández-Santos, M., Carvalho, L., Mejía, W., y León. G. 2009. Valoración morfométrica de la cabeza del espermatozoide del cerdo doméstico según su edad. *Revista científica, FCV-LUZ, XIX (2): 153-156.*
- Quintero-Moreno, A., Ramírez, M., Nava-Trujillo, H., Hidalgo, M., 2015. Comparison of two histologic stains in the evaluation of sperm head morphometric measurements in frozen-thawed bull semen. *Acta Microscopica Vol. 24, No.2. 103-110*
- Rahmatzadeh, M., Kohram, H., Zare Shahneh, A., Seifi-Jamadi, A., Ahmad, E. 2017. Antioxidative Effect of BHA in Soya Bean Lecithin-Based Extender Containing Glycerol or DMSO on Freezing Capacity of Goat Semen. *Reprod Domest Anim. 28: 1-7.*
- Rana, A., Majunder, G., Misra, S., Ghosh, A. 1991. Lipid change of goat sperm plasm membrane during epididymal maturation. *Biochemica et Biophysica Acta, 1061, 185-198.*
- Rodríguez, J., Palomar, M., García, J., 2012. Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *rev. esp.cir.oral. maxilofac .3 4(1):8-17*
- Rubio-Guillén, J. 2006. Efecto del proceso de criopreservación sobre la calidad seminal y fertilidad de toros Holstein, Brahman y sus mestizos. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. 103 p.
- Rubio-Guillén, J., D. González, J. Garde, M. Esteso, F. Fernández-Santos, J. E. Rodríguez-Gil, J. E., N. Madrid-Bury and A. Quintero-Moreno. 2007. Effects of cryopreservation on bull

spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Domest. Anim.* 42. 354-357.

Rubio-Guillén, J; D. González; A. Quintero-Moreno. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Rev. Científica, FCV-LUZ.* Vol. XIX (4): 382–389.

Rubio-Guillén, J., Montero, M., Portillo-Guevara, O., González-Villalobos, D., Aranguren-Méndez, J., Madrid-Bury, N., Villasmil-Ontiveros, Y., Quintero-Moreno, A. 2012. Comparación entre dos grupos raciales de ovinos tropicales mediante pruebas de viabilidad espermática. XIII Jornadas Científico Técnicas de la Facultad de Agronomía LUZ. 21-23/11/12. Maracaibo, Venezuela. 55p.

Rubio-Guillén, J. 2017. Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de espermatozoides ovinos bajo condiciones tropicales. Tesis Doctoral. Universidad del Zulia. 153 p.

Rubio-Parada, J. 2010. La Caprinocultura y su importancia socioeconómica en el área metropolitana de San José de Cúcuta. Tesis Maestría. UNET. San Cristobal. 105 p.

Safarinejad, M., 2008. Sperm DNA Damage and Semen Quality Impairment After Treatment With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Detected Using Semen Analysis and Sperm Chromatin Structure Assay. *The Journal of Urology* Vol. 180, 2124-2128.
DOI:10.1016/j.juro.2008.07.034

Salamon, S. y Maxwell, W. 1995. Frozen storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reprod. Sci.* 38:1-36.

- Saucedo L, Sobarzo C, Brukman NG, Guidobaldi HA, Lustig L, Giojalas LC, Buffone MG, Vazquez-Levin MH and Marin-Briggiler C (2018) Involvement of fibroblast growth factor 2 (FGF2) and its receptors in the regulation of mouse sperm physiology. *Reproduction* 156, 163–72.
- Silva, A., Sampaio, R. 2009. Anatomic ACL reconstruction: does platelet-rich plasma accelerate tendon healing? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*;17(6):676-82.
- Silva-Torres, A. y Hernández-Corredor, L. 2015. Movilidad y vitalidad de semen caprino criopreservado. *Revista REDCOLSI Nodo Norte de Santander*. Septiembre, Número 1 Pág 56 - 62
- Silva, P., y Gadella. B. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958–978.
- Senger, P. 2003. The organization and function of the male reproductive system; *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 4th. 44–79.
- Sepúlveda, K., Celis-Alba, D., Silva-Torres, A., Rodríguez, Y., Hernández-Corredor, L. 2018. Efecto de un diluyente a base de agua de coco en la morfometría y motilidad espermática de semen ovino. SIMPOSIO NACIONAL Agropecuario y Agroindustrial. SENNOVA. VI No.1. 39-43
- Smyth, S., McEver, R., Weyrich, A., Morrell, C., Hoffman, M., Arepally, G., French, P., Dauerman, H., Becker, R. 2009. Platelet Colloquium Participants. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*; 7: 1759–66.
- Spitzer, JC. 2000. Bull breeding soundness evaluation: Current status. In: *Tropic in bull fertility*, Chenoweth P. J, (Ed). International Veterinary Information Service. (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.

- Stephens RE, Prior G. Dynein from serotonin-activated cilia and flagella: extraction characteristics and distinct sites for cAMP-dependent protein phosphorylation. *Journal of Cell Science*. 1992; 103:999–1012. [PubMed: 1487508]
- Tabibzadeh, S., y Sun, X., 1992. Cytokine expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Hum Reprod* 7, 1214–21.
- Tamuli, M. y Watson, P. 1994 Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Anim Reprod Sci* 35: 247–54.
- Textor, J., Norris, J., Tablin, F. 2011. Effects of preparation method, shear force, and exposure to collagen on release of growth factors from equine platelet-rich plasma. *Am J Vet Res*;72(2):271-8.
- Valcárcel, A., De las Heras, M., Pérez, L., Moses, D. y Baldasarre, H. 1994. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*. 41:483–489.
- Varisli O, Uguz C, Agca C, Agca Y. 2009. Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science* 110: 256–268.
- Vásquez, J., Núñez, V., Florentini, E., Gonzales, J., Camargo, L., y Valdivia, M. 2013. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. *Livestock Science*, 152(1), 94–99.

- Vera-Muñoz, O. 2001. Evaluación seminal comparativa pre y postcongelación en machos bovinos. En: Reproducción Bovina. C. González- Stagnaro (Ed). Edics. Astro Data S. A. Fundación GIRARZ. Maracaibo-Venezuela. Cap: XII: 1 – 11.
- Vera-Muñoz, O., 2008. Fisiología de los espermatozoides bovinos. En: Desarrollo sostenible de ganadería doble propósito, C Gonzalez-Stagnaro, E. Soto-Belloso (eds.). Fundación GIRARZ. Ediciones ASTRODA S.A. Sección 5 (40): 495-504
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K., 2002. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57, 149-179.
- Vinson, G., Mehta, J., Evans, S., Matthews, S., Puddefoot, J., Saridogan, E., Holt. W., Djahanbakhch, O. 1996. Angiotensin II stimulates sperm motility. *Regul Pept*, 67:131-135.
- Watson, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*; 60–61: 481–92.
- Weyrich, A., Schwertz, H., Kraiss, L., Zimmerman, G. 2009. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*; 7: 241–6.
- Woelders, H. 1990. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Dom Ani Suppl* (1): 145-164.
- Wu, A., Sutovsky, P., Manandhar, G., Xu, W., Katayama, M., Day, B., Park, K., Yi, Y., Xi, Y., Prather, R., Oko, R. 2007. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. *J Bioll Chem*, 282:12164-12175.

Yániz, J. L. et al. 2015. Sperm population structure in high and low field fertility rams. *Animal Reproduction Science* 156(MARCH): 128–134.

Zhu, W. y Liu, X. 2000. Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian J Androl.* 2(2):135-138.