

Efecto de dos diluyentes a base de lecitina de soya sobre parámetros morfométricos en semen caprino

Effect of two soybean lecithin-based extenders in buck sperm head morphometric parameters

Leonardo Hernández-Corredor, Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA
Regional Norte de Santander
hernandezc@sena.edu.co

Jesús Dorado, Departamento de Medicina y Cirugía Animal,
Universidad de Córdoba, España
jdorado@uco.es

Armando Quintero-Moreno, Laboratorio de Andrología,
Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela
armando.quintero@scv.luz.edu.ve

Isabel Ortiz, Departamento de Medicina y Cirugía Animal,
Universidad de Córdoba, España
iortiz@uco.es

Antonio Buzón, Departamento de Medicina y Cirugía Animal,
Universidad de Córdoba, España
abuzon@uco.es

Marlín Corzo, Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA
Regional Norte de Santander
mccorzo@misena.edu.co

Manuel Hidalgo, Departamento de Medicina y Cirugía Animal
Universidad de Córdoba, España
midalgo@uco.es

Servicio Nacional de Aprendizaje - SENA
Centro CEDRUM,
Regional Norte de Santander

FECHA DE RECEPCIÓN: 28 DE MARZO DE 2014

FECHA DE ACEPTACIÓN: 23 DE MAYO DE 2014

RESUMEN

Diluyentes a base de lecitina de soya han sido usados en la criopreservación de semen caprino; sin embargo, no existe información en el efecto de la morfometría y vitalidad espermática. El objetivo del estudio fue comparar el efecto de dos diluyentes comerciales a base de lecitina de soya en semen posdescongelado, su efecto en la vitalidad y morfometría de la cabeza espermática. Al observar los resultados de la vitalidad y las dimensiones de la cabeza espermática (SHD) en la posdescongelación, usando Ovixcell, fueron más pequeñas. Una reducción en la SHD ha sido descrita en los procesos de criopreservación; por lo tanto, esta reducción después de la criopreservación puede ser relacionada con los sucesos de la criopreservación. En conclusión, la vitalidad y la SHD en el semen caprino posdescongelado con AndroMed fueron altamente significativas en comparación con el Ovixcell; esto puede ser relacionado con la mejor resistencia a la congelación seminal.

Palabras clave: cabros, diluyentes, vagina artificial.

ABSTRACT

The soybean lecithin extenders have been used for cryopreservation of buck semen; however, there is no information about its effect on sperm morphometry and vitality. The aim of this study was to compare the effect two commercial soybean lecithin-based extenders on post-thaw buck sperm head morphometric parameters. According to these results, the sperm head dimensions (SHD) of semen samples frozen and thawed using Ovixcell were smaller. A reduction in SHD has been previously described due to cryopreservation procedures. Then, a lower reduction of SHD after thawing could be related with better cryopreservation success. In conclusion, the SHD of goat semen frozen-thawed with AndroMed were significantly higher in comparison to Ovixcell, which could be related to better resistance to cryopreservation.

Keywords: Buck, Extender, Artificial Vagina.

INTRODUCCIÓN

En los animales de granja, la congelación de semen es una técnica muy utilizada en la inseminación artificial (IA) y en la técnica de fertilización in vitro (FIV) (Zanganeh, 2013).

La yema de huevo es el componente por excelencia en los diluyentes para almacenamiento y criopreservación del semen en especies como el toro, el morueco y el cabro. La lipoproteína de baja densidad es el mejor componente que posee la yema de huevo en la protección de la integridad de membrana en el proceso de criopreservación (Moussa *et al.*, 2002). Sin embargo, la yema posee el problema de ser un medio rico para bacterias y endotoxinas; asimismo, tiene un efecto tóxico sobre el esperma de búfalos, corderos y caprinos (Aboagla y Terada, 2004). Por esta razón, los diluyentes comerciales hoy en día llevan proteína vegetal (la lecitina de soya) como protector en la criopreservación (Gil *et al.*, 2003).

Los fosfolípidos que contienen el diluyente AndroMed lo hacen muy similar a los encontrados en la yema de huevo, sin el inconveniente de contaminación (Krishnahumar *et al.*, 2011).

Sistemas como el ASMA (Análisis Automático de Morfometría Espermática) llevan mucho tiempo valorando con exactitud y repetitividad las dimensiones de la

cabeza de espermatozoides de diferentes especies (Hidalgo *et al.*, 2008).

Los cambios en las dimensiones de la cabeza de los espermatozoide pueden ser factores internos del macho (pH, osmolaridad, patologías, daños cromosómicos), del método de extracción (contenido seminal) y de la criopreservación (toxicidad del medio) (Hidalgo *et al.*, 2006).

En reproducción animal muchos investigadores tratan de diseñar “el mejor análisis seminal” que pueda predecir la fertilidad y valore convenientemente la muestra (Quintero-Moreno *et al.*, 2003).

1. Materiales y métodos

1.1 Experimentación animal

Este estudio se llevó a cabo en Cúcuta (L 7°54'N, L 72°30'W), región Norte de Santander, entre agosto y diciembre de 2013. Se utilizaron cuatro machos cabríos (2-3 años de edad), alimentados con heno y agua. La toma de muestras se realizó con vagina artificial (40 °C), y fue desarrollada por aprendices del SENA. Durante 8 semanas se obtuvieron 32 eyaculados.

1.2 Medios

Los medios evaluados son Tris con base en lecitina de soya (AndroMed®, Ovixcell®).

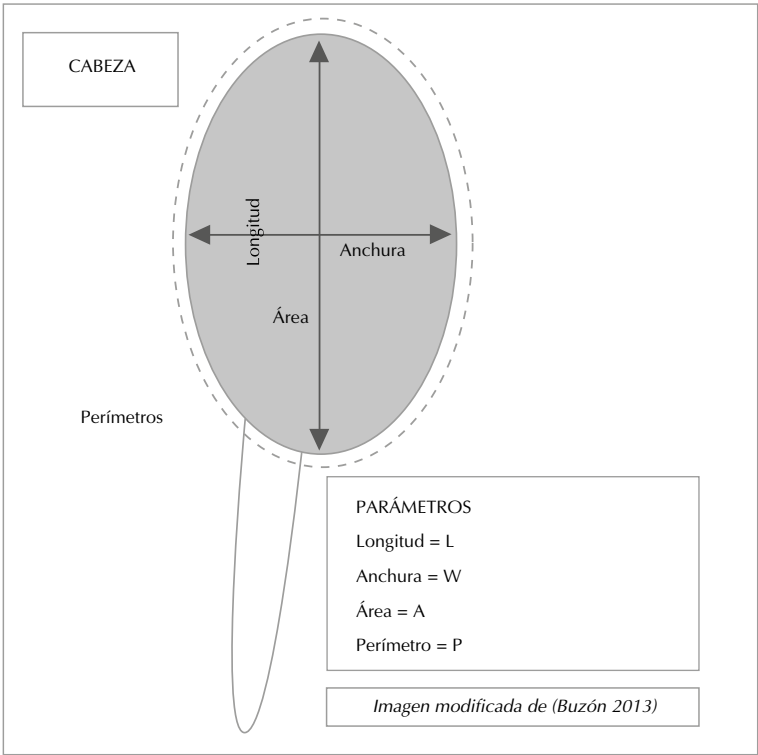
1.3 Procedimiento de laboratorio

En el estudio se utilizaron eyaculados con volumen mayor a 0,7 ml, más del 70% de motilidad espermática y una concentración espermática de $2,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml; los eyaculados se dividieron en dos alícuotas, se mezclaron con el medio en dilución 1:1 (semen:diluyente), se centrifugaron a 600 g por 20 minutos; el *pellets* se diluyó y luego se llenaron las pajillas a razón de 100 millones de espermatozoides/pajilla.

Análisis de la vitalidad y morfología. Se colocaron 10 µl en un portaobjetos a 37 °C en una platina termorre-

gurable y se mezclaron con 15 µl de colorante eosina-nigrosina (González *et. al.*, 2008). El frotis (extendido) se dejó secar por 30 minutos. Las placas se observaron en microscopio óptico a 1.000 X (aumento); se contaron 100 células espermáticas por placa. El resultado se expresa en porcentaje de espermatozoides vivos. Para evaluar la morfometría de la cabeza espermática, se utilizó sobre los extendidos de las muestras seminales la tinción Diff-Quick una hora más tarde de fijadas. La evaluación de la morfometría espermática (ASMA) se realizó en el laboratorio de reproducción animal de la Universidad de Córdoba (España).

Figura 1. Parámetros morfométricos evaluados en la cabeza del espermatozoide caprino



El procedimiento se llevó mediante el *software* Sper-Class Analyzer® (Microptic, Barcelona-España). Este equipo consta de un microscopio (Olympus BH-2; Tokio-Japón) equipado con un objetivo de 10 X y conectado a una videocámara (Sony CCD - IRIS SSC-M370; Sony Corporation, Tokio, Japón) que transmite las imágenes microscópicas hasta una tarjeta capturadora de video (Meteor II; Matrox Electronic Systems Ltd; Quebec-Canadá) ubicada en el interior de un PC (Procesador Pentium IV, Intel Inside, Filipinas). Antes de cada valoración se ajustaron los parámetros de iluminación y contraste, con el fin de optimizar las capturas de las células espermáticas, según metodología de Buzón (2013).

1.4 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron analizados mediante el Statistical Analysis System Software 9,0 para Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. EUA, 2004). Para los efectos de los medios (lecitina de soya) sobre las variables evaluadas de vitalidad seminal y sobre las dimensiones de la cabeza del espermatozoide (L, W, A, P) se utilizó el modelo lineal general del análisis de varianza (Proc GLM); cuando existieron diferencias se usó LSMEANS. Para identificar las subpoblaciones espermáticas se aplicó un análisis multivariado de agrupamiento no jerárquico mediante el procedimiento "Fastclus", el cual agrupa a los espermatozoides según

sus características morfométricas comunes, teniendo en cuenta la metodología de Martínez-Pastor *et al.*, 2005. Aquellos espermatozoides con medidas similares fueron asimilados a un mismo grupo (*cluster*); los de medidas diferentes se asignaron a grupos distintos. Para observar interacción entre las subpoblaciones y los medios (AndroMed vs. Ovixcell) sobre las dimensiones ya descritas se usó el PROC GLM.

2. Resultados y discusión

En el estudio fueron utilizados machos de conocida fertilidad y calidad seminal. Se encontraron muy pocas anomalías morfológicas. De las 32 muestras evaluadas (Tabla 1), donde se registraron 2.273 espermatozoides, al aplicar el procedimiento Outlayers, quedaron 2.140 células espermáticas para el estudio.

Al observar los cuadros 1 y 2 se tomaron los Prin1 y Prin2, ya que explican un 74,75% del modelo, aplicando la metodología de Martínez-Pastor *et al.* (2005). Utilizando la pseudo-t2, la pseudo-F y el criterio cúbico *clusterizado* (CCC) graficados teniendo en cuenta los picos de (CCC) y la pseudo-F combinadas con un valor pequeño de pseudo-t2, determinando cuatro subpoblaciones espermáticas (Gráfica C).

Los sistemas informáticos para el estudio de la morfología espermática en los últimos años han tenido importancia en la investigación de

subpoblaciones espermáticas (Hidalgo *et. al.*, 2008). En el 2004 Hidalgo obtiene medidas de $L = 8,55 \mu\text{m}$, $W = 4,25 \mu\text{m}$, $A = 29,90 \mu\text{m}^2$, $P = 22,42 \mu\text{m}$ en animales de la raza florida. Marcos-Jiménez *et. al.* (2006) obtuvieron medidas de $L = 8,21 \mu\text{m}$, $W = 3,54 \mu\text{m}$, $A = 24,34 \mu\text{m}^2$, $P = 21,34 \mu\text{m}$. Hidalgo *et. al.* (2006) obtuvieron medidas de $L = 8,55 \mu\text{m}$, $W = 4,26 \mu\text{m}$, $A = 29,92 \mu\text{m}^2$, $P = 22,42 \mu\text{m}$. Sin embargo, en la especie caprina existe poca información disponible para las medidas morfométricas del espermatozoide determinadas por ASMA

y los factores que afectan los cambios.

El efecto de la congelación en el semen ha sido ampliamente estudiado (Miró *et al.*, 2005; Dorado *et al.*, 2010; Núñez-Martínez *et. al.*, 2006; Flores *et. al.*, 2009). La composición bioquímica de la membrana que afecta el contenido de fosfolípidos y colesterol es responsable de la sensibilidad de los espermatozoides (Quintero-Moreno, 2003). Las características bioquímicas del diluyente poseen un rol importante en la viabilidad del semen.

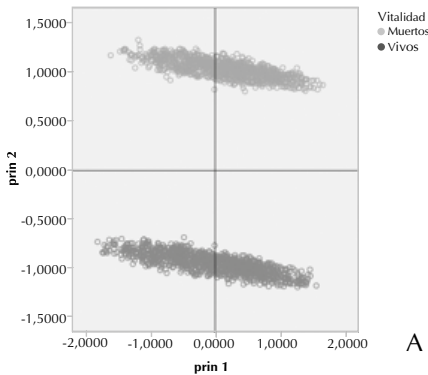
Cuadro 1. Análisis de componentes principales

Eigenvalues	Autovalor	Diferencia	Proporción	Acumulado
Prin1	2,7330	1,7289	0,5466	0,5466
Prin2	1,0041	0,4100	0,2008	0,7475
Prin3	0,5941	0,1384	0,1188	0,8663
Prin4	0,4556	0,2426	0,0911	0,9574
Prin5	0,2129		0,0426	1,0000

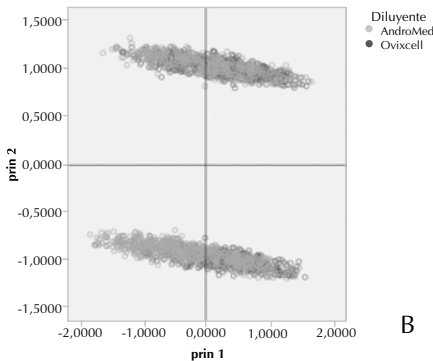
Cuadro 2. Eigenvectors

	Prin1	Prin2	Prin3
Vitalidad	0,0728	0,9821	0,1586
Longitud	0,5040	-0,1237	0,5473
Ancho	0,4775	0,0110	-0,6618
Área	0,5058	-0,0439	-0,3152
Perímetro	0,5065	-0,0780	0,3712

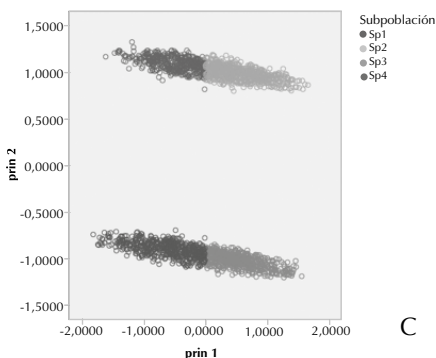
Gráfica A. Vitalidad espermática (espermatozoides vivos-muertos)



Gráfica B. Efecto de los diluyentes sobre espermatozoides caprinos (Andro-Med-Ovixcell)



Gráfica C. Subpoblaciones espermáticas



Al graficar la prin1 y la prin2, se observa cómo se separan marcadamente los espermatozoides vivos de los muertos (Gráfica A). Cuando se grafica con base en los diluyentes (Gráfica B), se puede observar cómo las dos gráficas se superponen, mostrando mayor porcentaje de muertos con el diluyente Ovixcell.

El proceso Fastclus detectó cuatro subpoblaciones para morfología. En la Gráfica C, la subpoblación 1 son espermatozoides de cabeza pequeña y poco anchos; no existen diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre los diluyentes AndroMed (19,67%) vs. Ovixcell (19,67%) de la subpoblación. La subpoblación 2 son espermatozoides de cabeza grande y anchos; existen diferencias significativas entre los diluyentes ($P \leq 0,05$), siendo mejor el AndroMed (36,04%) como diluyente que el Ovixcell (21,84%).

Subpoblaciones espermáticas vivas

La subpoblación 3 son espermatozoides de cabeza grande y ancha; existen diferencias significativas entre los diluyentes ($P \leq 0,05$), siendo mejor el Ovixcell (22,11%) como diluyente que el AndroMed (30,32%). La subpoblación 4 son espermatozoides de cabeza pequeña y no muy ancha; existen diferencias significativas entre los diluyentes ($P \leq 0,05$), siendo mejor el AndroMed (13,95%) como diluyente que el Ovixcell (36,37%).

Subpoblaciones espermáticas muertas

El origen de las subpoblaciones espermáticas no ha sido dilucidado aún, pero esta variabilidad se puede presentar en el proceso de maduración en el epidídimo y de allí presentar estas diferencias en la

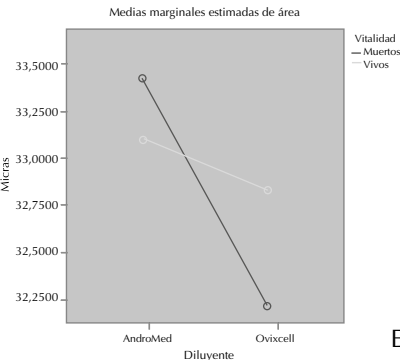
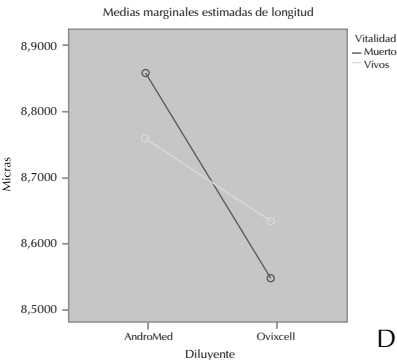
morfología (Peña *et. al.* 2005; González *et al.* 2008). Sin embargo, hoy en día se aceptan las subpoblaciones espermáticas caprinas (Dorado, 2003; Hidalgo, 2004) y de otras especies (Rubio-Guillén *et al.*, 2007; Peña *et.al.*, 2005; Maroto-Morales *et. al.*, 2012; Buzón, 2013).

Tabla 1. Subpoblaciones espermáticas encontradas en los espermatozoides caprinos en los diferentes medios

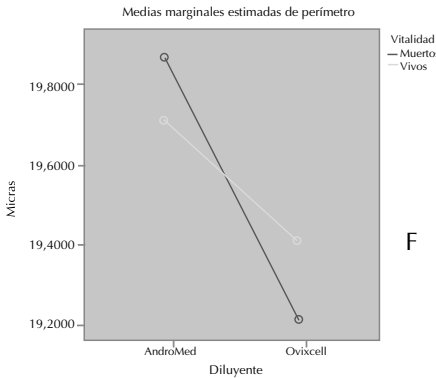
	AndroMed®					Ovixcell®				
	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Total	Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Total
N	203	372	313	144	1.032	218	242	245	403	1.108
Porcentaje de población	19,67	36,04	30,32	13,95	100	19,67	21,84	22,11	36,37	
Vitalidad (%)					55,71**					41,51**
Longitud de la cabeza (µm)	8,42 ±0,26	8,93 ±0,27	8,99 ±0,24	8,55 ±0,29	8,79 ±0,35**	8,31 ±0,30	8,91 ±0,29	8,95 ±0,29	8,29 ±0,31	8,57 ±0,43**
Ancho de la cabeza (µm)	4,08 ±0,12	4,30 ±0,12	4,28 ±0,12	4,05 ±0,14	4,22 ±0,16 N.S.	4,07 ±0,13	4,30 ±0,13	4,28 ±0,10	4,05 ±0,15	4,16 ±0,18 N.S.
Área de la cabeza (µm²)	30,81 ±1,69	34,34 ±1,90	34,49 ±1,88	31,09 ±1,79	33,24 ±2,47 N.S.	30,95 ±2,02	34,51 ±1,83	34,78 ±1,77	30,65 ±1,95	32,47 ±2,71 N.S.
Perímetro de la cabeza (µm)	18,92 ±0,68	20,13 ±0,68	20,28 ±0,73	18,95 ±0,69	19,77 ±0,92**	18,71 ±0,65	20,04 ±0,73	20,07 ±0,71	18,69 ±0,75	19,29 ±0,98**

** Diferencias significativas a P ≤ 0,001. N.S. No existen diferencias significativas a P ≥ 0,05.

Gráfica D. Interacción entre diluyentes y la vitalidad espermática con respecto a la longitud de la cabeza espermática. Gráfica E. Interacción entre diluyentes y la vitalidad espermática con respecto al área de la cabeza espermática.



Gráfica F. Interacción entre diluyentes y la vitalidad espermática con respecto al perímetro de la cabeza espermática.



En las gráficas D, E y F se observan las interacciones entre los diluyentes y la vitalidad. Las células muertas en AndroMed tienden a mostrar una mayor longitud, área y perímetro de la cabeza espermática con respecto al Ovixcell, que evidenciaron medidas inferiores. Por lo tanto, se observa que las células muertas en AndroMed tienen mayor longitud, área y perímetro que las células vivas, probablemente debido a que la célula se hidrata por los componentes del medio, mientras que se deseca con el diluyente Ovixcell. Las células muertas mostraron el tamaño de la cabeza más bajo como consecuencia de la pérdida de membrana, como describen Marco-Jiménez *et al.*, 2006.

La posible reacción fisiológica puede ser atribuida al estrés extracelular oxidativo, efectos del plasma seminal, que constituye la producción de radicales libres. Estos son sustancias del plasma seminal que

protegen el espermatozoide en el proceso de criopreservación (Barbaros *et al.*, 2013).

La deshidratación progresiva de los espermatozoides, la alta proporción de células con daño acrosomal y cambios en la distribución de enzimas en las membranas o diferencias en la estructura de la cromatina se pueden inducir en la criopreservación (Marti *et al.*, 2011). La vitalidad espermática después de la descongelación depende de muchos factores, como la técnica de congelación, la composición de los diluyentes, dilución, tiempos de congelación y método de descongelación (Aboagla y Terada, 2004).

Las diferencias en el tamaño de la cabeza entre los espermatozoides vivos y muertos posiblemente se deben a que estos últimos han modificado la función de la membrana y han perdido parte de su contenido intracelular como resultado de la degeneración (Gravance *et al.*, 1998).

Durante la fase de equilibrio, después de la adición del medio crioprotector, pero antes de la fase de congelación, las células inicialmente se encogen por el agua que fluye al exterior y luego se hinchan porque el agua y el crioprotector entran. Los espermatozoides vivos se encogen al llegar al equilibrio osmótico, dando como resultado una reducción menor a la del tamaño de

la cabeza de los espermatozoides muertos (Agca *et al.*, 2002).

Marco-Jiménez *et al.*, (2006) indican que la reducción en las medidas de la cabeza espermática de longitud, área y perímetro se da durante la fase de enfriamiento; el ancho se afecta en la fase de congelación y descongelación se presentan valores bajos. El gradiente osmótico a través de las membranas del espermatozoide se genera durante el ciclo de congelación-descongelación; los daños celulares se producen durante la

criopreservación: el efecto osmótico y la formación de hielo intracelular.

Los valores medios morfométricos obtenidos fueron superiores a los reportado por Gravance *et al.*, (1998), Hidalgo *et al.*, (2004, 2006) y Marcos-Jiménez *et al.* (2006).

Por el resultado del presente estudio, se observa que la morfología y la vitalidad se afectan por diluyentes con lecitina de soya como el Ovixcell®. Se encontraron valores muy superiores con AndroMed®.

REFERENCIAS

Aboagla, E., y Terada, T. (2004). Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62(6), 1160-1172.

Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, E., Liu, J., Critser, J. (2002). Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biol. Reprod.* 67, 1493-1501.

Barbaros, P., Tasdemir, U., Buyukleblebici, S., Orgurtas, T., Cosjun, E., Erol, H., Nuri, F., Safa, I. (2013). Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen-thawed Angora buck semen. *Small Ruminant Research* 113: 383-389.

Batista, M., Niño, T., Santana, M., Alamo, D., Castro, N., Reyes, R., González, F., Cabrera, F., Gracia, A. (2011). Influence of the preservation temperature (37, 20, 4, -196 °C) and the mixing of semen over sperm quality of Majorera bucks. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 281-288.

Buzón, A. (2013). *Análisis cinético del espermatozoide del caballo bajo el sistema Sperm Class Analyzer*. Universidad de Córdoba. Tesis Doctoral. 173 p.

De los Reyes, M., Palomino, J., Parraguez, H., Hidalgo, M., Saffie, P. (2011). Mitochondrial distribution and

meiotic progression in canine oocytes during in vivo and in vitro maturation. *Theriogenology* 75(2), 346-353.

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. (2010). The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm free ability. *Animal Reproduction Science* 121, 115-123.

Gravance, C., White, C., Robertson, K., Champion, Z., Casey, P. (1997). The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Anim. Reprod. Sci.* 49, 37-43.

Gil, J., Rodríguez-Irazoqui, M., Lundeheim, N., Soderquist, L., Rodríguez-Martínez, H. (2003). Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 59(5-6), 1157-1170.

Flores, E., Fernández-Novell, J., Peña, A., Rodríguez-Gil, J. (2009). The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology* 72, 784-797.

González, D., Quintero-Moreno, A., Garde, J., Estes, 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 FCV-LUZ*, vol. XVIII, (5), 570-577.
- 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, 35.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J. (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66(4), 996-1003.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Soler, C. (2008). Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Anim Reprod Sci* 103(3-4), 374-37.
- Krishnakumar, S., Whiteside, D., Dance, A., Elkin, B., Thundathil, J. (2011). Evaluation of an animal protein-free semen extender for cryopreservation of epididymal sperm from North American bison (Bison bison). *Theriogenology* 76(2), 252-260.
- Marco-Jiménez, F., Garzón, D., Peñaranda, D., Pérez, L., Viudes de Castro, M., Vicente, J. Y Asturiano, J. (2006). Cryopreservation of european spermatozoa: effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation and cryoprotectants. *Cryobiology*. Vol. 53, Issue 1, August, 51-57.
- Maroto-Morales (2012). Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (Ovis aries). Relaciones con la fertilidad. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos.
- Marti, J., Aparicio, I., García-Herreros, M. (2011). Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology*, 75(3), 473-81.
- Martínez-Pastor F., García-Macías, V., Álvarez, M., Herraiz, P., Anel, I., De Paz. (2005). Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process. *Biology of Reproduction* 72, 316-327.
- Miró, J., Lobo, V., Quintero-Moreno, A., Medrano, A., Peña, A., Rigau, T. (2005). Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 63, 1706-1716.
- Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57(6), 1695-1706.

- Núñez-Martínez, I., Morán, J., Peña, F. (2006). Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *Journal of Andrology* 27, 596-603.
- Peña, F., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-Martínez, I., Tapia, J., Ohannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H. (2005). Identification of Sperm Morphometric Subpopulations in Two Different Portions of the Boar Ejaculate and Its Relation to Postthaw Quality. *J. Androl.* 26, 716-723.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973-1990.
- Rubio-Guillén J, González D, Garde J, Esteso M, Fernández-Santos M, Rodríguez-Gil J, Madrid-Bury N, Quintero-Moreno A. (2007). Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Dom. Ani.*, 42, 354-357.
- Zanganeh, Z., Zhandi, M., Zare-Shahneh, A., Najafi, A., Mahdi, M., Mohammadi-Sangcheshmeh, A. (2013). Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation? *Small Ruminant Research* 114, 5.