

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EFFECTO DE LA VITAMINA A, D Y E SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y
CIRCUNFERENCIA ESCROTAL EN MACHOS CABRÍOS

Tesis

Que presenta ANDRÉS JUNIOR RODRÍGUEZ SÁNCHEZ

como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

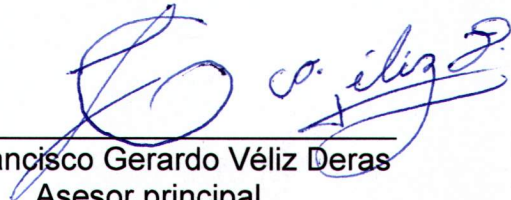
Torreón, Coahuila

Mayo 2021

EFFECTO DE LA VITAMINA A, D Y E SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y
CIRCUNFERENCIA ESCROTAL EN MACHOS CABRÍOS

Tesis

Elaborada por ANDRÉS JUNIOR RODRÍGUEZ SÁNCHEZ como requisito parcial
para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Asesor principal




Dra. Leticia R. Gaytán Alemán
Asesor



Dr. Oscar Ángel García
Asesor



Dra. Leticia R. Gaytán Alemán
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

A mi **Alma Terra Mater**, por abrirme sus puertas y ofrecerme la oportunidad de continuar con mi superación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca obtenida que me fue de ayuda durante mi maestría.

Al **Fondo Sectorial en Investigación en Materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos** (SAGARPA-CONACYT) por su generoso apoyo a la propuesta "Aumento de la productividad, competitividad y sustentabilidad de la cadena de carne y leche de cabras en sistemas extensivos del norte de México" (2017-4-291691), el cual generó gran parte de la información presentada en este documento.

A mis tutores Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras, Dra. Leticia Romana Gaytán Alemán y Dr. Oscar Ángel García, por su apoyo y conocimiento.

Especialmente a la **Dra. Guadalupe Calderón Leyva** y Dr. **Oscar Ángel García**, por el apoyo ofrecido en este trabajo. Gracias por su paciencia, tiempo y por permitirme utilizar sus conocimientos para mejorar mi aprendizaje.

Señora Dora Alicia Ramírez, Gracias por su amistad y compañía a lo largo de esta formación y todos los alimentos deliciosos que compartimos y disfrutamos en el estanquillo los "Gemelos".

A mis compañeros y amigos de la Universidad Demetrio Castro, Emmanuel Chávez, Fortunato Nava J., Gabriel Antonio Tamayo, Jorge Luis Jijón, José Ángel Flores, Juan Roberto, Liliana Hernández, Magdiel Rivera, María Fernanda Sánchez, Mariana Barragan y Priscila Michelle Orta.

Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

¡Gracias a ustedes!

DEDICATORIA

A **Dios** por permitirme llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi padre, **Andrés Rodríguez**, por todo el apoyo que me ha brindado para poder culminar la maestría, gracias por desear y anhelar siempre lo mejor para mí, llevo en mi el consejo que me dio “Es bonito salir adelante, pero es mucho mejor salir con tus seres queridos”.

A mi madre, **Teresa Sánchez Pérez (†)**, que, aunque haya partido de este mundo hace años, es un ángel que me ve y cuida desde el cielo, siempre estará en mi corazón y en cada logro en mi vida, cada reto superado se lo dedica a ella, Te quiero mamá.

A mis hermanos, **María Doris y Leodan Leonardo**, aunque me encuentro lejos de ustedes sé que cuento con su apoyo para sacar de ella la fuerza necesaria para salir adelante y cumplir mis metas, estoy agradecido con Dios por tenerlos en mi vida, por esas risas, alegría y tristeza que compartimos, ¡los quiero mucho hermanos!

A mis abuelitos, **Guadalupe Rodríguez y Andrés Rodríguez**, infinitas gracias por brindarme más apoyo del necesario después del fallecimiento de mi mamá, estaré eternamente agradecidos con ustedes, las palabras no bastan para describir el amor que me ofrecieron.

A mis tías, **Fidelia Rodríguez, Justina Rodríguez**, por el apoyo brindado, consejos, esperanzas y enseñanzas acerca de la superación, parte de este logro también se los debo a ustedes, muchas gracias tías.

Hoy se cumple una meta más que no solo es mía, el triunfo se los debo a todos ustedes, **Familia Ramírez Ramírez**: Ing. Rolando Ramírez, Conchita Ramírez y sus hijos Lupita, Cecy y Rolando, gracias por todos los consejos y apoyo incondicional brindado a un servidor, son mi otra familia en Saltillo, no tengo como pagarles todo esto, ¡muchas gracias!

Agradezco infinitamente a una persona muy especial, **Verónica Cande** por haberme apoyado, ¡gracias por creer en mí!

¡Hoy se cumple un meta que no solo es mía, el triunfo se los debo a ustedes!

*Faber est suae
quisque fortunae*

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis.....	4
1.2 Objetivo	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Interacción nutrición-reproducción	5
2.2 Antioxidantes y sus funciones en el organismo	5
2.3 Importancia de las vitaminas en la nutrición animal	8
2.4 Vitaminas y la reproducción del macho	9
2.4.1 Vitamina A.....	9
2.4.2 Vitamina E	10
2.4.3 Vitamina ADE.....	12
2.4.4 La Vitamina D.....	13
2.5 Espermatogénesis	15
2.5.1 Fases de la espermatogénesis	18
2.5.1.1 La fase proliferativa.....	18
2.5.1.2 La fase meiótica.....	18
2.5.1.3 La fase de diferenciación o fase espermatogénica.	18
MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. General.....	20
3.2 Localización y animales.....	20
3.3 Tratamiento de los animales	20
3.3 Peso vivo y condición corporal.....	21
3.4 Circunferencia escrotal	21
3.5 Colección y procesamiento del semen	21
RESULTADOS	24

DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	32
LITERATURA CITADA.....	33

Lista de cuadros

Cuadro 1. Medias (\pm eem) para circunferencia escrotal y parámetros de calidad seminal de machos cabríos tratados con Vitamina A, D y E (ADE), y no tratados (Control) bajo condiciones de fotoperiodo natural (26° LN).....	25
---	----

Lista de figuras

Figura 1. Relación entre la spermatogénesis y el eje hipotálamo- hipófisis- ganada- acción de las gonadotropinas.	17
Figura 2. Esquema de la spermatogénesis tomada de (sin cita).....	19

Lista de abreviaturas

%	Porcentaje
°	Grado centígrado
ATP	Adenosina trifosfato
CC	Condición Corporal
CE	Circunferencia Escrotal
CE	Circunferencia escrotal
CSA	Comportamiento Sexual Apetitivo
CSC	Comportamiento Sexual Consumatorio
D	Día
<i>et al.</i> ,	Colaboradores
FAO	Organización Mundial de las Naciones Unidad para la Alimentación y Agricultura
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GC	Grupo Control
GH	Factor de Crecimiento
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropina
GT	Grupo Tratado
IGF1	Factor de crecimiento semejante a la insulina
Kg	Kilogramos
LH	Hormona Luteinizante
LN	Latitud Norte
Mg	Miligramos
mL	Mililitro
Mpio	Municipio
N	Número de animales
NRC	National Research Council
P	Probabilidad
PC	Proteína cruda
PUFAS	Ácidos grasos poliinsaturados esterificados
PV	Peso Vivo
RA	Ácido trans-retinoico
RNS	Especies Reactivas de Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
Se	Selenio
T4	Testosterona
UI	Unidades Internacionales
UVB	Rayos ultravioletas
VAD	Deficiencia de vitamina A
VDR	Receptor de vitamina D
Vit-D	Vitamina D
Vit-A	Vitamina A
Vit-E	Vitamina E

RESUMEN

EFFECTO DE LA VITAMINA A, D Y E SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y CIRCUNFERENCIA ESCROTAL EN MACHOS CABRÍOS

ANDRÉS JUNIOR RODRÍGUEZ SÁNCHEZ
Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Dr. Francisco Gerardo Veliz Deras
Director de tesis

El objetivo de este estudio fue evaluar si la administración de vitaminas A, D y E (Vit ADE) mejora el desempeño reproductivo (libido y calidad seminal) en el macho cabrío. Un grupo de macho cabríos (GV, n=4) se trataron con 1mL de vitamina A, D y E (vit. A 500,000 UI; vit. D3 75,000 UI; vit. E 50 vía IM), mientras que un segundo grupo (GC, n= 4) recibió una inyección 0.5 mL de solución salina fisiológica para igualar condiciones de manejo. Ambos tratamientos fueron aplicados cada 7 días durante 28 días. La viabilidad (67% vs 73%), la motilidad masal (4.1 ± 0.8 vs. 4.7 ± 0.6), e individual (72 ± 10 vs. 65 ± 5) fueron diferentes entre los dos grupos (GC y GV, respectivamente; $P < 0.05$). Sin embargo, para la circunferencia escrotal (25.4 ± 1.0 cm), la latencia al eyaculado (21.0 ± 11.0 s), el volumen del eyaculado (0.9 ± 0.2 mL), la concentración espermática ($3878 \pm 300 \times 10^6/\text{mL}$) no mostraron diferencias entre los grupos ($P > 0.05$). Por lo anterior, se puede concluir que, bajo las condiciones de este estudio, la administración de las vitaminas A, D y E en machos cabríos mejora la calidad seminal.

Palabras clave: Circunferencia escrotal, latencia al eyaculado, machos cabríos, motilidad masal, vitamina A, D y E.

ABSTRACT

EFFECT OF VITAMIN A, D AND E ON SEMINAL QUALITY AND SCROTAL CIRCUMFERENCE IN MALE GOATS

ANDRÉS JUNIOR RODRÍGUEZ SÁNCHEZ
Master of Science in Agricultural Production

AUTONOMOUS AGRARIAN UNIVERSITY ANTONIO NARRO

Dr. Francisco Gerardo Véliz Deras
Thesis's director

The objective of this study was to evaluate whether the administration of vitamins A, D and E (Vit ADE) improves reproductive performance (libido and semen quality) in the male goat. A group of male goats (GV, n = 4) were treated with 1 mL of vitamins A, D and E (vit. A 500,000 IU; vit. D3 75,000 IU; vit. E 50 via IM), while a second group (GC, n = 4) received a 0.5 mL injection of physiological saline solution to equalize driving conditions. Both treatments were applied every 7 days for 28 days. Viability (67% vs. 73%), mass motility (4.1 ± 0.8 vs. 4.7 ± 0.6), and individual (72 ± 10 vs. 65 ± 5) were different between the two groups (CG and GV, respectively; $P < 0.05$). However, for scrotal circumference (25.4 ± 1.0 cm), latency to ejaculate (21.0 ± 11.0 s), ejaculate volume (0.9 ± 0.2 mL), sperm concentration ($3878 \pm 300 \times 10^6 / \text{mL}$) did not show differences between groups ($P > 0.05$). Therefore, it can be concluded that, under the conditions of this study, the administration of vitamins A, D and E in male goats improves semen quality.

Keywords: Scrotal circumference, latency to ejaculate, male goats, mass motility, vitamin A, D and E.

INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva en las explotaciones ganaderas es fundamental para aumentar la eficiencia reproductiva y productiva en los diferentes sistemas de producción animal (Almeida *et al.*, 2007). La fertilidad es el factor más importante desde el punto de vista económico, y conseguir altos índices de gestación en periodos cortos. Sin embargo, esto no ocurre si la habilidad de reproducción del macho se ve afectada (Almeida *et al.*, 2007; Sing *et al.*, 2018). En lo que respecta a la nutrición animal, además de la energía y proteínas y minerales, se encuentran las vitaminas que juegan un papel esencial sobre el desempeño reproductivo del macho (Talib Ali *et al.*, 2009; Granja *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

Un gran número de literatura describe la función biológica algunas vitaminas (A, D y E), en especial de la vitamina E (Vit-E) y sus aplicaciones sobre la prevención de enfermedades, debido a que participa en la mejora de la respuesta inmunitaria (Liu *et al.*, 2014), y desempeño reproductivo en los animales de granja (Talib Ali *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014). Se han revisado en muchos trabajos las funciones químicas y biológicas que juegan las vitaminas (Debier 2005), al igual que los efectos de suplementación en rumiantes con Vit-E (McDowell *et al.* 1996).

En el caso de los rumiantes, las vitaminas liposolubles (A, D, E), sólo pueden ser sintetizadas por los microorganismos del rumen, sin embargo, las vitaminas A, D y E deben ser aportadas en la dieta (Talib Ali *et al.*, 2009). En este sentido, en cuanto al papel de la Vit-E sobre la reproducción en el macho, es conocida como vitamina anti-esterilidad, y se conoce que su deficiencia conduce a la degeneración de los espermatozoides, testículos y túbulos seminíferos (Majid *et al.*, 2015).

En el caso de la vitamina A (Vit-A) también juega un papel esencial en el hombre, al mantener la espermatogénesis y buen funcionamiento del tracto genital (Clagett-Dame y Knutson, 2011), por lo contrario, su deficiencia afecta la espermatogénesis, sin embargo, tras la adición de Vit-A, se puede restablecer la

espermatogénesis estimulando la diferenciación espermatogonia de forma sincronizada en el hombre (Clagett-Dame y Knutson, 2011).

En el caso de la vitamina D (Vit-D), la a función principal, es el mantenimiento de la salud esquelética mediante la regulación de los procesos de absorción intestinal y excreción renal de calcio y fósforo, formación de hueso y movilización de minerales. Sin embargo, en las últimas décadas, numerosos estudios han informado que la deficiencia de Vit-D está asociada con muchos problemas de salud no esqueléticos, como enfermedades autoinmunes, hipertensión y cáncer (Zhou *et al.*, 2018). Esto constituye un apoyo importante para el papel de la Vit-D en el desempeño reproductivo de los mamíferos (Zhou *et al.*, 2018; Handel, 2016).

Además de las vitaminas A y D, la vitamina E (Vit-E) juegan un papel esencial importante al participar en la reproducción del macho ya sea sola o combinada. Los efectos de la Vit-E sobre la reproducción en machos se ha centrado en la espermatogénesis y la calidad del seminal, ya que la Vit-E juega un papel importante en el manejo del estrés oxidativo ya que los espermatozoides están sujetos a daño oxidativo debido a la alta tasa metabólica y la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en sus membranas. El estrés oxidativo (EO) también puede comprometer el desarrollo folicular y la actividad ovárica en la hembra (Liu *et al.*, 2014). La Vit-E y la Vit-A desempeñan papeles esenciales, entre ellos, el más importante, las funciones especializadas y sinérgicas, lo que da como resultado una secuencia de reacciones que convierten a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) en metabolitos inofensivos (Córdoba-Izquierdo, 2009).

Brown (1994) revisó los efectos de la nutrición sobre la reproducción en el macho y reconoció que los órganos reproductores de los animales (toros, carneros y verracos) son sensibles a la nutrición dietética, pero que los cambios inducidos por la nutrición en las funciones reproductivas son temporales. Sin embargo, pocos trabajos de centran en estudiar los efectos de la vitamina A, D y E sobre

el desempeño reproductivo y comportamiento sexual o libido en animales (Talib Ali *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014).

Recientemente varios trabajos se han enfocado sobre los efectos potenciales de la deficiencia de Vit-E sobre el desempeño reproductivo de los rumiantes (Liu *et al.*, 2014). Por lo anterior, el desempeño reproductivo en el macho se puede mejorar a través de la suplementación de vitaminas y minerales, ya sean solas o combinadas. Lo anterior puede reflejarse en una mejor calidad seminal del macho (Talib Ali *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014).

1.1 Hipótesis

La aplicación de vitamina A, D y E promueve una mejor calidad seminal y mayor circunferencia escrotal en machos cabríos de la raza Alpino-francés.

1.2 Objetivo

Evaluar un posible efecto de la aplicación de vitamina A, D y E para promover una mejor calidad seminal y una mayor circunferencia escrotal en machos cabríos de la raza Alpino-francés.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Interacción nutrición-reproducción

La nutrición es el principal factor que influye sobre el desempeño reproductivo de los mamíferos, ya que tiene un efecto sobre en la expresión de ciclos reproductivos (actividad estral, gestación), si existe un déficit de nutrientes tanto para crecimiento y mantenimiento de los animales no serán activadas las funciones antes mencionadas (Talib Ali *et al.*, 2009; Granja *et al.*, 2012). Las vitaminas y los minerales son nutrientes de suma importancia en la reproducción animal ya que su deficiencia de estos, pueden afectar severamente los procesos biológicos incluyendo la espermatogénesis y la calidad del semen en el macho (Talib Ali *et al.*, 2009).

Las vitaminas como la vitamina E (Vit-E) y el selenio (Se) son macronutrientes que comparten su papel biológico, ya que ambos ayudan mantener bajas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de lípidos y peróxilos (Granja *et al.*, 2012; Zubair, 2017). En efecto, existen interacciones negativas entre nutrientes que llevan a un desbalance nutricional que pueden empeorar la eficiencia reproductiva (Campos *et al.*, 2008).

2.2 Antioxidantes y sus funciones en el organismo

La Vit-E (α -tocoferol) es un compuesto orgánico soluble en grasa y comúnmente está presente en las membranas celulares. La Vit-E se conoce por sus potentes antioxidantes que inhiben la peroxidación lipídica (PL) generada por los radicales libres (RL) hidroxilo y superóxido. Esta vitamina protege la membrana celular de los espermatozoides de los daños provocados por las ROS (Dias-Zagoya *et al.*, 2008; Zubair, 2017).

La Vit-E y el Se son micronutrientes esenciales que intervienen como antioxidantes en el organismo (Zubair, 2017). La Vit-E es una mezcla de tocoferoles y tocotrienoles, que actúan inhibiendo la lipoperoxidación a través del secuestro de los radicales piróxilos y evitar que estos puedan reaccionar con los

ácidos grasos que forman parte de la membrana celular (Dias-Zagoya *et al.*, 2008). La vitamina E está presente en muchos tejidos humanos y su contenido es mayor en las láminas de lipoproteínas de las membranas celulares, su función es prevenir la destrucción de estas membranas por el RL provocado por el metabolismo celular. (Dias-Zagoya *et al.*, 2008; Zubair, 2017).

Por otra parte, el Se es elemento traza que es necesario para la síntesis de vitaminas, producción de hormonas, producción de energía, transporte de oxígeno, así como procesos fisiológicos en el crecimiento y reproducción de los animales, este se encuentra en mínimas cantidades en los tejidos animales, las funciones del Se es la de mantenimiento y desarrollo de las funciones en el organismo (McDowell, 2000). Las características antioxidantes de la Vit-E hacen que reaccione con moléculas que presentan un electrón apareado llamado RL y transformarlo en un compuesto menos activo y eléctricamente más estable (Mahmoud *et al.*, 2013).

El principal papel de los antioxidantes liposolubles como el de la Vit-E es el de proteger a los lípidos contra el daño oxidativa (Febles *et al.*, 2002; Fraire-Cordero, 2013). Por ejemplo, después de la pérdida de hidrógeno (un proceso llamado iniciación) y la adición de moléculas de oxígeno, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) o las lipoproteínas de los fosfolípidos en la membrana generarán grupos piróxilo (Febles *et al.*, 2002). Esto es muy importante en la membrana, porque el tocoferol generará hidroperóxido lipídico relativamente estable cuando reacciona con los radicales peroxilos lipídicos. Posteriormente, los radicales libres del tocoferol interrumpirán la reacción en cadena de los radicales libres y evitarán la peroxidación lipídica (Febles *et al.*, 2002; Fraire-Cordero, 2013). Por otra parte, los efectos protectores de la Vit-E se complementan con los sistemas de enzimas Glutación- Peroxidasa (GP) y ambos dependen de la presencia de Se (Membrillo-Ortega *et al.*, 2011; Zubair, 2017).

En mamíferos, el papel mejor descrito para la Vit-E es sobre la función muscular y su intervención en la vía de señalización celular de la proteína quinasa y regulación de las enzimas involucradas en la cascada del ácido araquidónico,

como es el caso de otros mamíferos, sin embargo, los rumiantes no sintetizan Vit-E, pero sí es necesaria en su dieta (van y callan, 2001).

La Vit-E y Se actúan en conjunto para prevenir daños celulares (Mahmoud *et al.*, 2013). Por tanto, ambos forman parte del sistema antioxidante del organismo frente al estrés oxidativo (EO). Esta condición es provocada por el desequilibrio entre los ROS y los antioxidantes en el organismo. Por ejemplo, en términos de reproducción, la falta de ambos puede provocar daños en los espermatozoides, deformidad y, en última instancia, infertilidad (Bansal y Bilaspuri, 2011; Agarwal *et al.*, 2014). Sin embargo, la suplementación de Se ha demostrado que, en el macho caprino, mejora el estado antioxidativo y los niveles de algunas hormonas (T4, triyodotironina) en plasma seminal y suero sanguíneo, lo anterior, protege a los espermatozoides contra el daño oxidativo, lo cual se traduce en una mejor calidad seminal (Kumar *et al.*, 2013). Además, la deficiencia de Vit-E y Se disminuye la respuesta inmune y comportamiento productivo de la hembra (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2005).

El Se en el organismo forma un componente de varias enzimas llamadas selenoproteínas (Silva *et al.*, 2000). La enzima GP contiene Se en su estructura química y una de sus funciones es evitar la formación de RL, previniendo así el daño por oxidación tisular (Córdoba-Izquierdo, 2009). Hay una selenoproteína con funciones protectoras relevantes en la cápsula mitocondrial del espermatozoide (Ahsan *et al.*, 2014). Trabajos realizados en sementales ovinos en donde la administración de Se y la Vit-E mejoraron la calidad del semen, y se asoció con una mayor concentración de T4 y mayor actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GP) en suero sanguíneo (Mahmoud *et al.*, 2013). Además, al comparar tratamiento con Vit-E y Se se demostró que el Se juega un papel muy importante en la determinación del número de espermatozoides de reserva y células de Sertoli, mientras que la Vit-E, no afectó dichos criterios evaluados (Kendall *et al.*, 2000).

2.3 Importancia de las vitaminas en la nutrición animal

Las vitaminas, minerales y antioxidantes pueden mejorar la ingesta nutricional. Recientemente se ha descrito, especialmente aquellos con altas propiedades antioxidantes, que también mejoran la fertilidad. (Dragsted, 2008). En los suplementos dietarios además de las vitaminas, minerales, antioxidantes y la energía, se encuentra las vitaminas, entre las que encontramos la A, D, E, B, K, C, entre otras. Las necesidades de vitaminas hidrosolubles (B y C) en los rumiantes adultos se satisface a través de la síntesis realizada por los microorganismos que se encuentran presentes en el rumen. Sin embargo, es importante mencionar que se necesita un adecuado aporte de ciertos minerales para la síntesis de vitamina B12. Se ha descrito que sólo los microorganismos del rumen son capaces de efectuar la síntesis de vitamina K, siendo las vitaminas A, D y E aportadas por la dieta (Romero y Bravo, 2012; Meléndez y Bartolomé, 2017). Cuando una sequía prolongada (más de 6 meses) y las reservas de hepáticas de retinol del animal son insuficientes para compensar la deficiencia, el aporte dietético de Vit-A es muy importante. La insuficiencia de Vit-A puede causar discapacidad visual y afectar la actividad de los epitelios gonadales y afectar la reproducción de los ovinos. (Romero y Bravo, 2012).

El pasto forrajero y el heno verde son las principales fuentes de la mayoría de las vitaminas (aportan en mayor cantidad vitaminas A, E y K). Algunos ejemplos incluyen: alfalfa y heno verde. Además, se pueden administrar vitaminas y minerales a los animales en momentos críticos, por ejemplo, vitaminas antes del parto y sales minerales antes y durante la época de empadre, entre otros. La Vit-D se sintetiza en la piel, siempre que el animal esté expuesto a suficiente luz solar. En cuanto al cobalto (Co), este es un mineral necesario para la síntesis de vitamina B12 por los microorganismos del rumen. La deficiencia de cobalto se manifiesta a través de la deficiencia de vitamina B12, lo que conduce a trastornos del metabolismo energético en animales jóvenes, lo que resulta en un crecimiento reducido.

2.4 Vitaminas y la reproducción del macho

2.4.1 Vitamina A

La Vit-A (retinol) se obtiene de la dieta en forma de éster de retinilo o carotenoide. Se almacena como un éster (principalmente en el hígado) o se metaboliza más para apoyar las funciones de los tejidos en el varón (Clagett-Dame y De Luca, 2002). El requerimiento de Vit-A en la reproducción se reconoció por primera vez a principios de la década de 1900's, y poco después se dio a conocer su importancia sobre los ojos y desarrollo embrionario. Una mayor comprensión de la gran cantidad de procesos de desarrollo que requieren Vit-A surgen los primeros estudios de deficiencia nutricional en embriones de rata, y luego de estudios genéticos en ratones (Clagett-Dame y Knutson, 2011).

En la actualidad, se cree generalmente que el ácido *trans*-retinoico (RA; por sus siglas en inglés) es la forma de Vit-A que favorece la reproducción tanto en el hombre como en la mujer, así como el desarrollo embrionario. Esta conclusión se basa en la capacidad de revertir la mayoría de los procesos reproductivos y bloqueos del desarrollo encontrados en la deficiencia de Vit-A inducida por medios nutricionales o genéticos con RA (Clagett-Dame y De Luca, 2002; Clagett-Dame y Knutson, 2011).

Se ha demostrado que la Vit-A es necesaria para los procesos de reproducción en el varón. Algunos trabajos mostraron que en la deficiencia de Vit-A, provoca daños en el epitelio del epidídimo, la próstata y la vesícula seminal que cesa la espermatogénesis (Clagett-Dame y Knutson, 2011). Por otro lado, los primeros trabajos mostraron que el RA no se podía convertir de nuevo en retinaldehído y retinol in vivo indicando que el RA por sí solo no podía mantener la visión normal o la reproducción. Sin embargo, recientemente existe un respaldo al papel importante que juega la RA en la reproducción tanto en el varón como la mujer (Clagett-Dame y Knutson, 2011).

La Vit-A también es esencial para el mantenimiento del tracto genital del varón y la espermatogénesis, sin embargo, su deficiencia puede traer como

consecuencia una disminución de la espermatogénesis y la integridad de las células de Sertoli que comprometen la barrera hemato-testicular en el hombre (Puerta-Suarez *et al.*, 2019).

Estudios recientes muestran que la Vit-A participa en un mecanismo de señalización para iniciar la meiosis en la gónada de la hembra durante la embriogénesis. Trabajos posteriores realizados en animales mostraron que en los testículos de rata con una severa deficiencia de Vit-A permanecen las espermatogonias indiferenciadas, células de Sertoli y un pequeño número de espermatozoides preleptoteno, mientras que, en el ratón, la espermatogénesis se detiene en la etapa de espermatogonias, y estos resultados demuestran que tras la adición de Vit-A, se puede restablecer la espermatogénesis estimulando la diferenciación espermatogonial A a A1 de forma sincronizada (Clagett-Dame y Knutson, 2011).

2.4.2 Vitamina E

La Vit-E (α -tocoferol) es un compuesto orgánico soluble en grasa y comúnmente está presente en las membranas celulares. La Vit-E se conoce como por sus potentes antioxidantes que inhiben la peroxidación lipídica generada por los RL hidroxilo y superóxido. Esta vitamina protege la membrana celular de los espermatozoides de los daños provocados por las ROS (Dias-Zagoya *et al.*, 2008; Zubair, 2017). La Vit-E, es una vitamina liposoluble, considerada como el principal antioxidante en las membranas celulares y en las LDL, junto al γ -tocoferol, son esenciales en la defensa celular (Córdoba- Izquierdo *et al.*, 2009).

La Vit-E es bien reconocida como el principal antioxidante soluble en lípidos que rompe la cadena y previene la peroxidación de lípidos. en tejidos de mamíferos (Liu *et al.*, 2014). La Vit-E también llamada vitamina antiesterilidad o factor X, se encuentra ampliamente distribuida en las plantas y se encuentra en forma natural como alfa, beta, gamma y delta- tocoferoles o tocotrioles, siendo el tocoferol la forma con el valor nutricional más alto. Se ha utilizado como promotor de la fecundidad, y funciona como antioxidantes primarios de lípidos, además se

asocia al Se formando parte del denominado sistema de defensa antioxidante del organismo (Dias-Zagoya *et al.*, 2008; Fraire-Cordero *et al.*, 2013; Zubair, 2017).

Además, el papel especial de la Vit-E es la utilización del oxígeno a nivel celular o como parte de los sistemas enzimáticos respiratorios de las células (Córdoba-Izquierdo, 2009.; Fraire-Cordero *et al.*, 2013). Sin embargo, los efectos protectores de la Vit-E deben complementarse con los sistemas glutatión-peroxidasa dependientes del Se (Mahmoud *et al.*, 2013). Lo anterior, debido a que las membranas biológicas están compuestas principalmente por moléculas de fosfolípidos, colesterol y proteínas que se encuentra unidas a esta, y deben protegerse contra la peroxidación como resultado de una peroxidación de lípidos en la membrana da como resultado la rotura de la membrana (Córdoba-Izquierdo, *et al.*, 2009).

En la reproducción animal los efectos de la Vit-E se han centrado en la espermatogénesis y la calidad del semen del macho, sin embargo, existen pocos estudios sobre los efectos de la Vit-E en el inicio de la pubertad y la libido del macho (Liu *et al.*, 2014). Los estudios *in vitro* han demostrado que el uso de Vit-E tienen un efecto sobre la calidad seminal al mejorar la motilidad y capacidad de fertilización de los espermatozoides en la penetración del óvulo de hámster (Zubair, 2017). De manera similar, en estudios *in vivo*, demuestran que la suplementación de Vit-E es eficaz en disminuir el daño en el número y la motilidad de los espermatozoides causada por las ROS (Zubair, 2017). La suplementación de esta vitamina por vía oral tiene importantes efectos beneficiosos sobre la motilidad de los espermatozoides mediante la reducción de malondealdehído (MDA), que se conoce como el producto final de la peroxidación lipídica (Zubair, 2017)

Por estas razones, el estado de Vit-E es importante para la eficiencia reproductiva tanto en machos como hembras (Liu *et al.*, 2014). Además, la deficiencia de Vit-E se ve potencialmente agravada por la falta de otros nutrientes. implicados en el manejo del EO y la función inmunológica, como el Se y los aminoácidos azufrados. Se requiere una concentración de Se de 0.1 mg/kg de MS en los

piensos para mantener la competencia inmunológica en las ovejas (Liu *et al.*, 2014).

El papel más importante que juega la Vit-E es el EO. Por ejemplo, los espermatozoides están sujetos al daño oxidativo debido a la alta tasa metabólica y a su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana. Además, el EO también puede comprometer el desarrollo folicular y la actividad ovárica en la hembra. La Vit-E también participa en la mejora de la respuesta inmunitaria (Liu *et al.*, 2014).

Resultados sobre la administración de la Vit-E, ya sea en dosis oral o inyectada, en dos experimentos en carneros dio como resultado una mejor calidad del semen, incluido un aumento del volumen de eyaculación, concentración de espermatozoides y motilidad en los machos tratados (Yue *et al.* 2010; Mahmoud *et al.* 2013). Además, se encontró que el número de espermatozoides muertos y anormales se redujo en el experimento en el que se examinó la morfología de los espermatozoides (Mahmoud *et al.* 2013).

Diferentes investigaciones indican que la Vit-E en conjunto con el Se indican que estos dos micronutrientes juegan un papel fundamental en la espermatogénesis. Deficiencias de Vit-E producen degeneración testicular. La Vit-E tiene un efecto antioxidante en los espermatozoides por lo que aumenta la motilidad y capacidad fecundante de los mismos. En un estudio, la combinación antioxidante de vitamina C y E redujo sinérgicamente el grado de oxidación de la membrana del espermatozoide, mejorando así la calidad de la crioconservación del espermatozoide en estado congelado y manteniendo la motilidad (Membrillo-Ortega *et al.*, 2011).

2.4.3 Vitamina ADE

La vitamina E y A desempeñan papeles esenciales, entre ellos, el más importante, las funciones especializadas y sinérgicas, lo que da como resultado una secuencia de reacciones que convierten a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) en metabolitos inofensivos. Con

algunas excepciones, los microminerales y las vitaminas no pueden sustituirse completamente entre sí (Bansal y Bilaspuri, 2011; Agarwal *et al.*, 2014).

Las consecuencias del desequilibrio en microminerales y vitaminas. son bastante diferentes a los de un desequilibrio en macrominerales. Mientras que el desequilibrio macromineral cambia la absorción y la utilización de elementos individuales, Se, Mn, Zn, Cu, S, Vit-E y Vit-A funcionan sinérgicamente dentro de una serie de vías bioquímicas esenciales para el manejo de las ROS y RNS. Las ROS son especies químicas reactivas que contienen oxígeno. Ejemplos, incluyen peróxidos, superóxido, radical hidroxilo y oxígeno singlete. Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son una familia de moléculas derivado de óxido nítrico y superóxido (Bansal y Bilaspuri, 2011; Agarwal *et al.*, 2014).

2.4.4 La Vitamina D

A la vitamina D (Vit-D) actualmente se le considerada una prohormona más que una vitamina, a la cual se le atribuyen múltiples e importantes funciones que van más allá de la homeostasis cálcica. El descubrimiento de su receptor y la expresión de la enzima 1 α -hidroxilasa en diferentes tejidos del organismo, origino un creciente interés por la Vit-D. Esto ha llevado a la descripción de una gran cantidad de efectos de la vitamina D en diferentes tejidos y en varios procesos fisiológicos (Boisen *et al.*, 2018).

La vitamina D genera principalmente colecalciferol a través de la síntesis de 7-dehidrocolesterol en la piel y la acción de los rayos ultravioleta B (UVB). Otra fuente de obtención de Vit-D es una dieta en forma de colecalciferol y ergocalciferol, aunque existen pocos alimentos ricos en Vit-D (Torres *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, se ha considerado que el principal papel fisiológico de la Vit-D es el desarrollo y mantenimiento de la salud esquelética (Yao *et al.*, 2018). Se demostró que la deficiencia de Vit-D es la causa del raquitismo hace casi un siglo, pero durante las últimas dos décadas, numerosos estudios han relacionado la deficiencia de Vit-D con el desarrollo de una amplia gama de trastornos no

esqueléticos, incluido el desarrollo de numerosas enfermedades inflamatorias, neoplásicas y autoinmunes. Por lo general, se ha observado una variación considerable en los niveles circulantes de metabolitos de la Vit-D en poblaciones humanas sanas (Handel *et al.*, 2016).

El receptor de vitamina D (VDR) se expresa en varios tejidos en todo el cuerpo, incluidos los órganos reproductores. La presencia de VDR es un requisito previo para que la Vit-D sea sensible al órgano y un número creciente de estudios en humanos y animales han demostrado que la función reproductora masculina es bajo la influencia de la Vit-D (Boisen *et al.*, 2018).

La Vit-D puede influir en las células de los testículos no solo directamente a través del RVD, también indirectamente a través de la regulación de algunas de estas hormonas o mediante la regulación de otros factores como calcio y fosfato, y crecimiento de fibroblastos. Los efectos de la Vit-D en la reproducción del macho dependen también de las concentraciones y el tiempo durante el desarrollo / adultez cuando las gónadas están expuestas a la Vit-D. Además, la influencia de la Vit-D sobre células de tipo específico es probable que los tipos in vitro sean compensados por otros factores o células in vivo. A comprender el papel de la Vit-D en la reproducción, es fundamental comprender la función de los espermatozoides con mayor detalle (Yaho *et al.*, 2018).

La función principal de la Vit-D es el mantenimiento de la salud esquelética mediante la regulación de los procesos de absorción intestinal y excreción renal de calcio y fósforo, formación de hueso y movilización de minerales. Sin embargo, en las últimas décadas, numerosos estudios han informado que la deficiencia de Vit-D está asociada con muchos problemas de salud no esqueléticos, como enfermedades autoinmunes, hipertensión y cáncer. La presencia de Vit-D receptores en el tracto reproductivo de mujeres y hembras de otras especies, como ovejas, cabra, ratón y rata y en los tractos reproductivos de machos ovinos indica que la Vit-D puede influir en el rendimiento reproductivo (Zhou *et al.*, 2018).

Yao *et al.* (2018) muestran que los diversos patrones de expresión del VDR y las enzimas que metabolizan la Vit-D en el tracto reproductivo del carnero en

diferentes etapas de desarrollo y los espermatozoides sugieren que desempeña un papel potencial en la espermatogénesis.

La deficiencia de Vit-D se ha asociado con el desarrollo de muchas enfermedades humanas y con un rendimiento reproductivo deficiente en roedores de laboratorio. Actualmente no tenemos idea de cómo la selección natural actúa directamente sobre la variación en el metabolismo de la Vit-D debido a la falta total de estudios en animales salvajes (Zhou *et al.*, 2018). Por ejemplo, en existe una ventaja evidente de aptitud reproductiva para las mujeres con mejor estatus de Vit-D, lo que sugiere que está mediada por una asociación con la fecundidad en lugar de la atención materna posparto. Esto constituye un apoyo importante para el papel de la Vit-D en el desempeño reproductivo de los mamíferos y la primera observación directa de la selección natural que actúa sobre el metabolismo de la Vit-D en la naturaleza (Zhou *et al.*, 2018; Handel, 2016).

Si bien el papel esencial de la Vit-D en el recambio óseo y función y para el transporte de calcio en el intestino y riñón es un conocimiento bien establecido, la participación de Vit-D en la función reproductora en el varón ha tenido relevancia recientemente (Blomberg Jensen, 2012; Handel, 2016; Zhou *et al.*, 2018).

2.5 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso biológico importante en la reproducción del macho. La interacción entre las células germinales del macho y las células somáticas durante la espermatogénesis, son necesaria para actividad reproductiva del macho (Yang *et al.*, 2020). La espermatogénesis es un proceso complicado que depende de la función celular normal y de la señalización célula-célula entre 4 tipos de células: células germinales, de Sertoli, peritubulares y de Leydig (Figura.2). La producción de testosterona (T4) a partir de las células de Leydig es fundamental para la espermatogénesis (O'Hara y Smith, 2015).

El espermatozoide es una célula altamente especializada que sufre cambios genéticos, moleculares y fisiológicos que no se han visto en otras células (Roldan y

Gomendio, 2006). Desde un punto de vista evolutivo, los espermatozoides son un modelo celular particularmente interesante porque son las células más dispersas en los organismos, exhibiendo tamaños y formas muy variables (Pitnick et al., 2009).

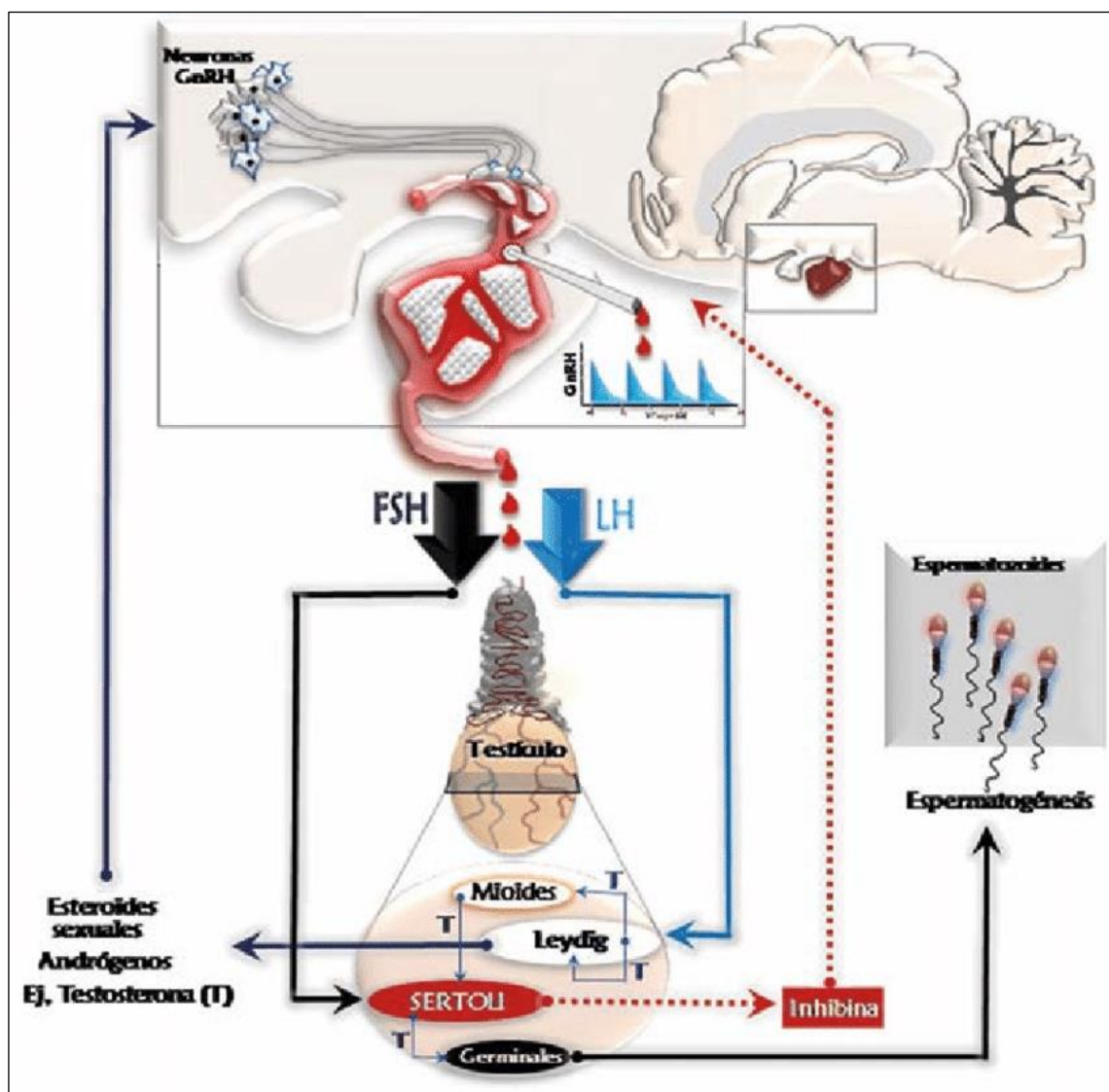
La espermatogénesis es el proceso de producción de espermatozoides por el epitelio seminífero durante el cual las células madre espermatogoniales generan espermatozoides, que diferencian, multiplican y generan espermatozoides. Esto ocurre dentro de los túbulos seminíferos, que son el componente principal del parénquima testicular en los testículos del semental (Hafez y Hafez, 2007).

En los mamíferos la espermatogénesis está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, por lo tanto, la producción de espermatozoides es un proceso complejo que depende de la secreción de las diferentes hormonas en el organismo como hormonas metabólicas (GH, IGF1), gonadotropinas (Figura 1), esteroides, proteínas, factores de crecimiento, entre otros (GF1), así como la modulación paracrina y autocrina de muchas sustancias. En conjunto con la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormonas de la pituitaria anterior, hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas testiculares como los andrógenos y la inhibina. Se ha descrito que en los testículos la síntesis androgénica en las células de Leydig es estimulada por la LH, por lo tanto la producción espermática local es regulada por estos andrógenos que a la vez realizan una retroacción negativa hacia el hipotálamo para controlar la liberación de GnRH y así la expansión de la espermatogénesis en la pubertad. También es importante mencionar que la T4 es la que mantiene y restaura el proceso de espermatogénesis en los testículos de animales adultos (Bustos y Obregón, 2012).

Los principales factores en la producción de espermatozoides son:

- 1) Células germinales: Mediante la división y diferenciación celular generan la formación de espermatozoides.

- 2) Células de Leydig: Son las productoras de testosterona en los espacios intertubulares, hormona imprescindible para que se produzca la meiosis.
- 3) Células de Sertoli: Aportan la estructura y generan el microclima adecuado para que la espermatogénesis se realice de manera adecuada. Esta estructura se localiza en el interior de los túbulos seminíferos.



4)

Figura 1. Relación entre la espermatogénesis y el eje hipotálamo-hipófisis-gonada-acción de las gonadotropinas.

2.5.1 Fases de la espermatogénesis

2.5.1.1 La fase proliferativa.

Esta fase inicia después de la pubertad y continua durante toda la etapa reproductiva del macho, la fase proliferativa se caracteriza porque las espermatogonias se dividen de una manera rápida y sucesiva por mitosis: tipo A0 a las A1-A4, las intermedias, y tipo B. Todas ellas representan estadios sucesivos del desarrollo de la espermatogonia (Hafez y Hafez, 2007).

2.5.1.2 La fase meiótica.

Esta es una fase prolongada donde el material genético es recombinado y segregado. El espermatocito primario realiza su primer división meiótica (reduccional) generando a los espermatocitos secundarios. Las fases de esta división son iguales a los que ocurren en la meiosis de la hembra. En la fase meiótica se reduce el número de cromosomas somáticos y sexuales. De tal manera que un espermatocito secundario recibe el cromosoma X y el otro el cromosoma Y. Posteriormente se genera una segunda división meiótica por cada espermatocito secundario se producen dos espermátidas (Hafez y Hafez, 2007).

2.5.1.3 La fase de diferenciación o fase espermatogénica.

Cuando las espermátidas están en contacto con el citoplasma de las células de Sertoli se inicia una transformación estructural; comienza a diferenciarse primero la cabeza (formada casi exclusivamente por el núcleo), el acrosoma y la cola para generar espermatozoides estructuralmente equipados para fertilizar a un óvulo. (Hafez y Hafez, 2007).

Elementos celulares del ciclo espermatogénico:

Espermatogonias: Están contenidas en la capa de los túbulos seminíferos y proceden de los gonocitos.

Espermatocitos: Son el resultado de la mitosis de espermatogonias y son las células germinativas que sufren división meiótica. Al final de la profase meiótica coincide con la fase 4 del epitelio seminífero, durante la que suceden rápidamente la metafase, anafase y telofase. En este momento aparecen los espermatocitos secundarios.

Espermátidas: Es la suma de todos los cambios nucleares, estos cambios determinan el producto final: espermatozoides.

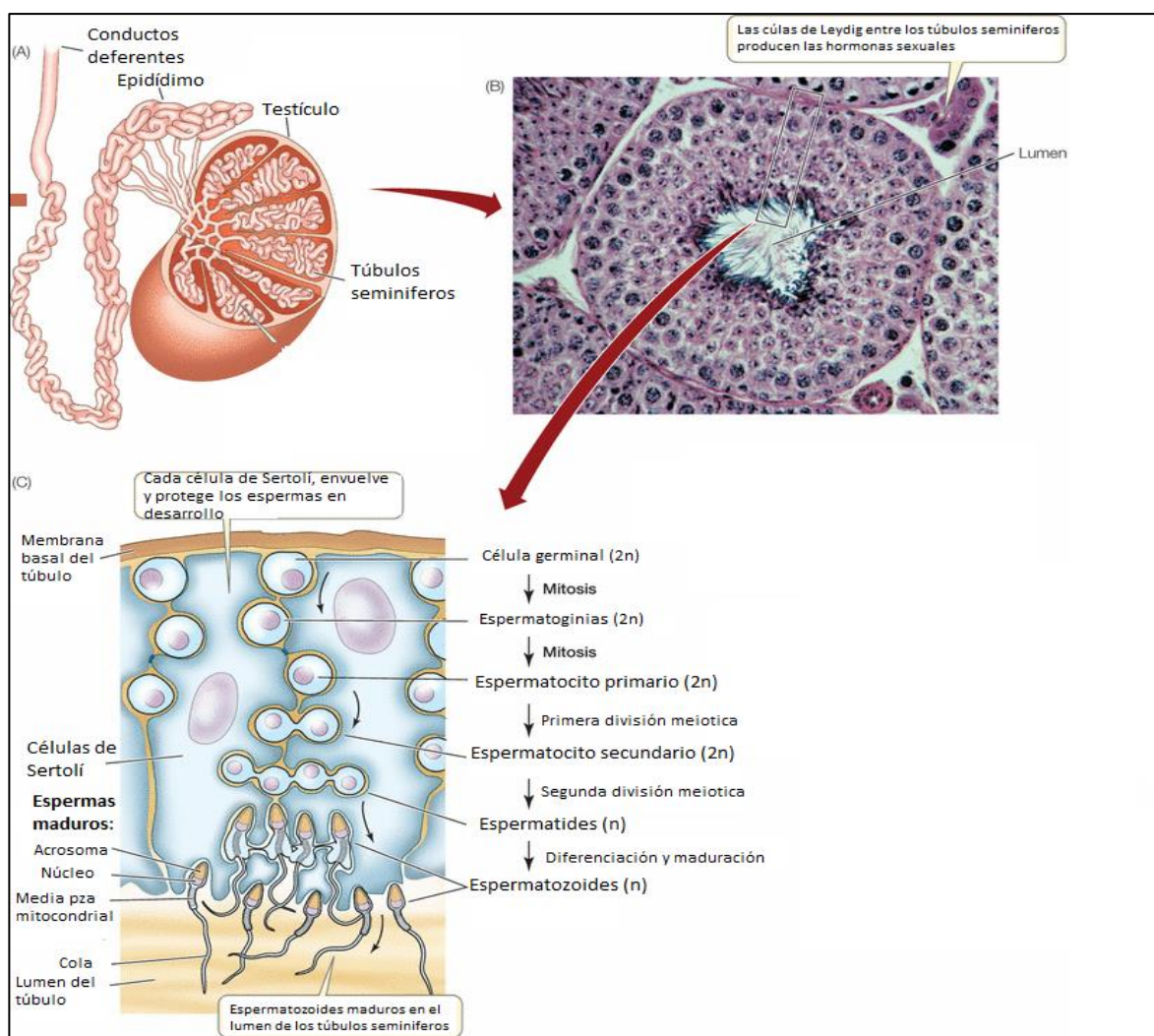


Figura 2. Esquema del espermatogénesis tomada de (sin cita)

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. General

Todos los métodos y manejo de las unidades experimentales utilizadas en este estudio fueron en estricto acuerdo con los lineamientos para el uso ético, cuidado y bienestar de animales en investigación a nivel internacional (FASS, 2010) y nivel nacional (NAM, 2002) con número de referencia de aprobación institucional UAAAN-UL con clave 38111- 425501002-2431.

3.2 Localización y animales

El experimento se realizó en el norte de México, en el Centro Caprino de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (26° de Latitud Norte y 104° de Longitud Oeste), durante los meses de septiembre y octubre. El área de estudio se encuentra a una altitud 1120 msnm, con una precipitación media anual de 230 mm y con temperatura promedio de 24 °C, máxima de 41 °C en mayo y junio, y mínima de -1 °C en diciembre y enero (CONAGUA, 2015). Se utilizaron machos adultos de la raza Alpino-francés (n = 8, de 1.5 a 2 años de edad), homogéneos en cuanto a peso vivo (PV; 48.2 ± 8.6 kg) y condición corporal (CC; 2.6 ± 0.2 unidades); con fertilidad probada previo al estudio experimental a través de evaluaciones frecuentes de calidad seminal. Durante el periodo experimental, los machos se alimentaron dos veces al día (800 h y 1800 h), a libre acceso con una dieta basada en heno de alfalfa (18% PC, 1.95 Mcal de EM) y 100 g de concentrado comercial (21% PC, 1.7 Mcal EM) en base a sus requerimientos nutricionales (NRC, 2007). Los machos tuvieron libre acceso al agua limpia y sales minerales y un periodo de adaptación de 3 semanas previas a la investigación.

3.3 Tratamiento de los animales

Se utilizaron 8 machos cabríos, los cuales fueron divididos en 2 grupos. Un primer grupo, (ADE, n=4) se les aplicó 1mL de vitamina A, D y E (vit. A 500,000 UI; vit. D3 75,000 UI; vit. E 50 vía IM), mientras que un segundo grupo (CONT) recibió

una inyección 0.5 mL de solución salina fisiológica para igualar condiciones de manejo. Ambos tratamientos fueron aplicados cada 7 días durante 30 días.

3.3 Peso vivo y condición corporal

A lo largo del estudio, tanto el peso vivo como la condición corporal se midieron cada 7 días durante 30 días. El peso corporal fue determinado por la mañana antes de que los machos fueran alimentados. Se utilizó una báscula digital con una capacidad de 400 kg y división de 0.1 kg (Torrey, Modelo Eqm-400). La CC se evaluó mediante estimación de la masa muscular y grasa de la región lumbar bajo la técnica descrita por (Walkden-Brown *et al.*, 1997), esta actividad fue evaluada por un mismo técnico durante todo el periodo experimental.

3.4 Circunferencia escrotal

La circunferencia escrotal fue determinada con una cinta métrica flexible graduada en milímetros; ésta fue medida en la parte más ancha de ambos testículos bajo la técnica descrita por Cruz-Castrejón *et al.* (2007).

3.5 Colección y procesamiento del semen

El semen fue colectado por la mañana (800 a 1000 h) cada 3 d, durante tres semanas, se usó como estímulo para la extracción de semen una hembra en actividad estral. El semen fue recolectado con una vagina artificial estándar para ovinos y caprinos, mantenida a una temperatura de 38 °C, por lo que se precalentó a 42 °C previo a la recolección., Después de cada extracción el semen fue sumergido inmediatamente en baño maría a 37 °C para su posterior análisis macroscópico y microscópico durante los siguientes 10 minutos.

Latencia a la eyaculación. La hembra en celo permaneció fija y los machos se expusieron con un tiempo no mayor a 301s para hacer la extracción. Los machos que no eyacularon durante ese lapso se retiraron y se les considera como rechazo a la eyaculación (Calderón- Leyva *et al.*, 2017).

Volumen del eyaculado (VEC; %). Se determinó con un tubo cónico de vidrio de 15 mL graduado a 0.1 mL.

Concentración espermática. La concentración espermática utilizando un fotómetro SDM1 (SpermaCue, Minitüb, Tiefenbach, Germany), la cual consistió en depositar 10 µg de la muestra del semen a través una microcubeta para fotómetro SDM 1 y después es fijada exactamente en la posición correcta de medición al fotómetro para hacer el análisis. La concentración de semen se expresó en células espermáticas/mL (10^6 /mL).

Motilidad masal (MM; %). Se evaluó con el uso de una placa térmica para laboratorio con temperatura ajustada a 37°C, colocando una gota de semen puro (20 µl) sobre una lámina portaobjetos en el microscopio óptico con objetivo de 10x, y de acuerdo con el movimiento observado se asignó un puntaje de escala arbitraria de 1 a 5, donde 1 = 25%, y 5 = 100% de espermatozoides móviles (Mahsud *et al.*, 2013).

Motilidad individual (MI; %). La motilidad individual, se determinó en base a la proporción de espermatozoides progresivamente móviles, para ello, se colocó una gota (10µL) de semen sobre una lámina portaobjetos y fue cubierta con una laminilla cubreobjetos; posteriormente se observó al microscopio con objetivo de 40x.

Viabilidad espermática (VE; %). La viabilidad espermática, se evaluó mediante el uso de la técnica de tinción con eosina-nigrosina (Kafi *et al.*, 2004), se observaron al menos 200 espermatozoides por muestra mediante microscopio óptico, utilizando el objetivo de 100X, y se calculó el porcentaje de células vivas (sin teñir) y de células muertas (teñidas de color rosa). Todas las evaluaciones fueron realizadas siempre por el mismo evaluador calificado.

Color y pH seminal.

El color seminal se comprobó paralelo al volumen in consistió en la observación continua y directa, a través de la utilización del tubo de vidrio para recolección de semen. El color seminal colectado fue blanco, blanco lechoso, y blanco-cremoso. Mientras que para la determinación del potencial de hidrogeniones se utilizaron tiras reactivas de PH con escala del 1 al 14. Para la medición del pH fue de la

siguiente manera, las tiras reaccionaban con la muestra de semen e inmediatamente se teñía de color y se comparaba con el nivel de pH descrita en la escala descrita en el frasco de las tiras reactivas.

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante un ANOVA usando el procedimiento Modelo Lineal General (GLM). Las medias obtenidas de los parámetros seminales, peso vivo, condición corporal, olor y pH fueron comparadas usando una prueba de t. Se contempló el efecto del uso de los tratamientos, y la interacción tiempo por tratamiento. Todos los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico SAS V9.1 (SAS, 2005). Las diferencias fueron consideradas significativas a un valor de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

En el cuadro 1, se muestra el resultado de circunferencia escrotal y de calidad seminal y de los machos tratado con vitamina A, D y E.

La circunferencia escrotal no mostro diferencias estadísticas entre ambos grupos ($p>0.05$). No existió diferencia entre tiempo de tratamiento entre grupos para al igual que para la interacción tiempo por tratamiento en la latencia al eyaculado, volumen y concentración espermática no mostraron diferencias ($P>0,05$). Sin embargo, en la motilidad masal, viabilidad y motilidad individual se encontró diferencia significativa entre tratamientos e interacción tiempo por tratamiento.

Cuadro 1. Medias (\pm em) para circunferencia escrotal y parámetros de calidad seminal de machos cabríos tratados con Vitamina A, D y E (ADE), y no tratados (Control) bajo condiciones de fotoperiodo natural (26° LN).

Días	Tto.	Circunferencia escrotal (cm)	Latencia al eyaculado (s)	Volumen (mL)	Concentración ($\times 10^6$)	Conc. x Vol.	Motilidad masal (1-5)	Motilidad individual (%)	Viabilidad (%)
0	ADE	25 \pm 1	18 \pm 5	0.8 \pm 0.1	4153 \pm 105	3322 \pm 486	5.0 \pm 0.0	75 \pm 8	72 \pm 8
	CONT	26 \pm 2	16 \pm 8	0.7 \pm 0.0	4073 \pm 123	2849 \pm 86	4.5 \pm 0.3	56 \pm 6	67 \pm 6
7	ADE	25 \pm 1	12 \pm 7	0.7 \pm 0.1	4157 \pm 113	2910 \pm 438	4.8 \pm 0.3	77 \pm 4	75 \pm 4
	CONT	26 \pm 2	7 \pm 3	0.7 \pm 0.2	3887 \pm 216	2721 \pm 585	4.8 \pm 0.3	76 \pm 2	76 \pm 2
14	ADE	25 \pm 1	26 \pm 21	0.8 \pm 0.2	3862 \pm 346	3087 \pm 677	4.8 \pm 0.3	84 \pm 1	76 \pm 1
	CONT	26 \pm 2	7 \pm 2	1.0 \pm 0.1	4078 \pm 122	4078 \pm 204	3.5 \pm 0.3	67 \pm 10	60 \pm 10
21	ADE	25 \pm 1	101 \pm 67	1.0 \pm 0.1	3838 \pm 159	3838 \pm 1048	4.7 \pm 0.3	64 \pm 20	76 \pm 20

	CONT	26 ± 2	23 ± 10	0.8 ± 0.2	4209 ± 171	3367 ± 645	4.5 ± 0.3	82 ± 1	60 ± 1
28	ADE	26 ± 1	10 ± 3	0.8 ± 0.2	3596 ± 489	2877 ± 1105	4.9 ± 0.2	72 ± 10	71 ± 10
	CONT	26 ± 2	11 ± 4	1.0 ± 0.3	3292 ± 774	3292 ± 1487	4.0 ± 0.6	54 ± 12	45 ± 12
42	ADE	25 ± 1	7 ± 2	1.0 ± 0.1	4213 ± 85	4213 ± 550	5.0 ± 0.0	62 ± 4	81 ± 4
	CONT	26 ± 2	8 ± 2	1.2 ± 0.2	4135 ± 90	4962 ± 569	4.3 ± 0.7	54 ± 3	75 ± 3
<hr/>									
Valor de P			0.145	0.629	0.621	0.714	0.112	<0.0001	0.030
Tiempo			0.106	0.395	0.232	0.433	0.489	<0.0001	0.038
Grupo			0.159	0.553	0.854	0.571	0.004	<0.0001	0.018
Interacción			0.375	0.663	0.879	0.763	0.460	0.195	0.348

DISCUSIÓN

Los presentes resultados sugieren que la suplementación de vitaminas ADE, durante 42 días, aumenta la calidad seminal en los machos cabríos. En efecto, la motilidad tanto basal como individual fueron mejores en los machos suplementados con vitaminas ADE, además la viabilidad también fue mejor en estos machos, que en los no suplementados. Esta mejora en la calidad seminal pudo deberse a un efecto de la Vitamina A y E, principalmente. En efecto, se ha mencionado que la Vit-E (α -tocoferol) que es un compuesto orgánico soluble en grasa puede estar presente en la membrana plasmática de las células espermáticas, y como tiene una acción como potentes antioxidantes pudieron inhibir la peroxidación lipídica (PL) generada por los radicales libres (RL) hidroxilo y superóxido, de la membrana celular de los espermatozoides, evitando los daños provocados por las ROS (Yue *et al.*, 2010; Zubair, 2017), lo que dañaría a los espermatozoides, disminuyen principalmente su viabilidad y motilidad. En efecto, los espermatozoides están sujetos a un gran daño oxidativo debido a la alta tasa metabólica, lo que provoca una alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en sus membranas, y si no hay antioxidantes estos dañarían esta membrana, con lo que la viabilidad y motilidad de los espermatozoides se verían comprometida. Por otra parte, la Vit-A (retinol) estudios recientes muestran que la Vit-A participa en la espermatogénesis y pudo potencializar el efecto de la Vit-E, o actuar en sinergia con esta, ya que también esta vitamina tiene efecto de antioxidante, por lo que pudo ayudar a la mejora de

la calidad espermática (Clagett-Dame y Knutson, 2011). Los rumiantes no sintetizan Vit-E, por lo que debe ser suministrada en su dieta (Van y Callan, 2001), sin embargo, los forrajes y los henos verdes son la fuente principal de la Vitamina A, E y K, y si estos no están en abundancia, como probablemente sucedió con la Vit-E en este estudio. Mientras que la Vit-A también se obtiene de la dieta en forma de éster de retinol o carotenoide, la cual se almacena como un éster (principalmente en el hígado), sin embargo, esta no puede estar presente en niveles adecuados cuando hay sequías prolongadas (Clagett-Dame y De Luca, 2002). Por lo anterior, es probable que ni la vitamina A y E estuvieran en los niveles suficientes para impedir la oxidación en células que tiene un alto metabolismo, como son los espermatozoides, en el grupo Control, mientras si fue así en el grupo experimental.

Por otra parte, el volumen de eyaculado y el número de espermatozoides/mL como el total/eyaculado no vario en el presente estudio, probablemente fue debido a dos factores, que la espermatogénesis (formación de espermatozoides) dura 60 días en promedio, y como el presente estudio solo duro 42 días, es probable a que si la suplementación de vitaminas ADE, tuviera algún efecto, esto se vería reflejado después de este tiempo, ya que los espermatozoides que fueron obtenidos en los eyaculados, probablemente ya estaban formados. Por ejemplo, se conoce que la Vit-A juega un papel importante al participar en la transición (espermatogonias de tipo A -A1) y posterior conversión de espermatogonias diferenciadas en espermatoцитos, que representan la iniciación de la meiosis, también requiere actividad de receptores a la Vit-A. La diferenciación de espermatoцитos secundarios y el proceso de espermiogénesis

(espermatidas redondas a espermatidas alargadas, luego espermatozoides) proceso que requiere testosterona (Hogarth y Griswold, 2010). En efecto, todo el proceso de espermatogénesis tiene una duración entre 64 a 74 días, los cuales se dividen en diferentes etapas, donde la primera dura 16 días durante el cual las espermatogonias se dividen mediante la **mitosis, durante estas etapa las células las espermatogonias (tipo A) están indiferenciadas, y luego viene la meiosis etapa en la cual la cual las espermatogonias ya están diferenciadas (A1) y se ven influenciada por las hormonas esteroideas como la FSH la cual está regulada por la mitosis** que se da del día 16 al 24 (primera meiosis) y luego en 8 h viene la segunda **meiosis, la cual está regulada por la testosterona y es donde se da la diferenciación de espermatoцитos secundarios, y luego** durante 24 días más se lleva a cabo la última etapa, que es **espermiogénesis proceso en el cual las espermátides adquieren su forma alargada y pasar a hacer esperas maduros**. Las primeras fases la **espermatogénesis se dan la proliferación o multiplicación, de crecimiento, y la maduración, de las espermatogonias en las espermatidas**, mientras en la última es la espermiogénesis (Hogarth y Griswold, 2010). Estos incluyen la conversión de espermatidas en esperma, que se divide en cuatro etapas: Etapa de Golgi: el comienzo del desarrollo del acrosoma (a partir de los gránulos del complejo de Golgi) y la formación de la cola del esperma. Etapa de campana: el acrosoma forma una capa en la parte frontal del núcleo y los flagelos comienzan a sobresalir. Fase del acrosoma: el acrosoma dirige y cubre aproximadamente 2/3 del núcleo. Fase de maduración: el núcleo se condensa y se descartan las partes citoplasmáticas innecesarias. El tejido mitocondrial se encuentra en la

parte inferior de los flagelos, lo que garantiza la energía necesaria para mover los flagelos. En esta última fase (espermatogénesis) es en la que probablemente la Vit-E tuvo efecto, ya que avaro esta etapa, además que en esta los espermatozoides tiene una gran actividad metabólica, por el alto contenido de mitocondrias lo que da muchos desechos metabólicos los que pueden ir a la membrana celular y con ello ocasiona en esta el este oxidativo, lo que impidió la adición de Vit-E, en nuestro estudio. En efecto, se sabe conoce que la Vit-E es el principal componente del sistema antioxidante de los espermatozoides (Zubair, et. al. 2015), y aumenta los espermatozoides totales, producción y concentración de espermatozoides en carneros (Azawi y Hussein, 2013). Además, una deficiencia de Vit-E puede conducir a daños en los órganos reproductivos, como espermatozoides degenerados, daño testicular y degeneración de los túbulos seminíferos (Yue *et al.*, 2010).

Por otra parte, en las primeras fases del espermatogénesis la suplementación de vitaminas ADE no tuvo efecto, ya que no se pudo mejorar la cantidad espermática. En efecto, la concentración y volumen espermático fue similar en ambos grupos. Esto probablemente fue debido a que el estudio no duro el tiempo adecuado (más de 64 días), o porque en estas etapas no hay un metabolismo elevado por parte de las células espermatogonias o espermatidas. Esto posibilidad es que los efectos las vitaminas ADE, no sean tan eficientes para aumentar la espermatogénesis la cual necesitarían estimular y aumentar la división celular, y/o los líquidos seminal, lo cual se vio reflejado también en ausencia de un incremento del diámetro testicular, el cual es un reflejo un

aumento de la espermiogenesis, lo que daría un aumento en la producción de células, tanto espermatides con aumento de la división célula y aumento de la células de Sertoli, las cuales nutren a las primeras, además de incrementar el tamaño de las células de Leyding aumentando los niveles de testosterona, con lo cual se incrementaría los niveles de olor, y de comportamiento sexual (libido), lo cual no se detectó en el presente estudio, por lo nuevamente sugiere que la adición de vitaminas ADE no afecto estas etapas, ni este metabolismo, además que el efecto principal de la Vit-E es el impedir el estrés oxidativo, y no el metabolismo celular.

Por otra parte la Vit-D aunque es importante para el metabolismo general, y puede influir en las células de los testículos no solo directamente a través de los receptores de vitamina D (RVD), además que interviene en la reproducción del macho el desarrollo/madurez tanto directamente como indirectamente a través de la regulación de algunas de otras hormonas o mediante la regulación de otros factores como calcio y fosfato, y crecimiento de fibroblastos (El-Sakka, 2018; Masters, 2018), la Vit-D puede sintetizada en la piel, siempre que los animales estén expuestos a suficiente luz solar, por lo que la suplementación de esta vitamina pudo haber influido pero de una forma más limitada hay que estos animales estuvieron expuestos a suficiente luz natural (Romero y Bravo, 2012).

CONCLUSIÓN

Los resultados bajo las condiciones de este estudio nos permiten concluir, que la administración de las vitaminas A, D y E en machos cabríos mejora la calidad seminal, lo que puede reflejarse en un mejor desempeño reproductivo en el macho y mayor fertilidad.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & Du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The world journal of men's health*, 32(1), 1.
- Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M. H., & Iqbal, Z. (2014). Role of selenium in male reproduction—A review. *Animal reproduction science*, 146(1-2), 55-62.
- Almeida, A. M., Schwalbach, L. M. J., Cardoso, L. A., & Greyling, J. P. C. (2007). Scrotal, testicular and semen characteristics of young Boer bucks fed winter veld hay: The effect of nutritional supplementation. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 216-220.
- Azawi, O. I., & Hussein, E. K. (2013). Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 C. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 4, No. 3, p. 157). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*, 2011.
- Bathgate, R. (2011). Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. *Reproduction in domestic animals*, 46, 23-25.
- Blé-Castillo, J. L., Díaz-Zagoya, J. C., & Méndez, J. D. (2008). Suplementación con vitamina E, ¿benéfica o dañina?. *Gaceta Médica de México*, 144(2), 147-154.
- Boisen, I. M., Hansen, L. B., Mortensen, L. J., & Jensen, M. B. (2018). Vitamin D, reproductive biology, and dysfunction in men. In *Vitamin D* (pp. 797-824). Academic Press.
- Brown, B. W. (1994). A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. *Reproduction Nutrition Development*, 34(2), 89-114.
- Burk, R. F., & Hill, K. E. (2005). Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.*, 25, 215-235.
- Bustos Obregón, E., & Torres-Díaz, L. (2012). Reproducción estacional en el macho. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1266-1279.
- Calderón-Leyva, M. G., Meza-Herrera, C. A., Arellano-Rodríguez, G., Gaytan-Alemán, L. R., Alvarado-Espino, A. S., Gonzalez-Graciano, E. A., ... & Véliz-Deras, F. G. (2017). Effect of Glutamate Supplementation upon Semen Quality of Young Seasonally Sexual-Inactive Dorper Rams. *Journal of Animal Research*, 7(3), 419.
- Clagett-Dame, M., & DeLuca, H. F. (2002). The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annual review of nutrition*, 22(1), 347-381.
- Clagett-Dame, M., & Knutson, D. (2011). Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients*, 3(4), 385-428.
- Clagett-Dame, M., & Knutson, D. (2011). Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients*, 3(4), 385-428.
- Cruz-Castrejón, U., Véliz, F. G., Rivas-Muñoz, R., Flores, J. A., Hernández, H., & Moreno, G. D. (2007). Response of sexual activity in male goats under

- grazing conditions to food supplementation and artificial long day treatment. *Técnica Pecuaria en México*, 45(1).
- Debier, C., & Larondelle, Y. (2005). Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition*, 93(2), 153-174.
- Díaz-Zagoya, J. C. (2008). Suplementación con vitamina E, ¿beneficia o daña? *Gaceta médica de México*, 144(2), 147-154.
- Dragsted, L. O. (2008). Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *European journal of nutrition*, 47(2), 3.
- FASS. 2010. Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching, 3rd ed. Federation Animal Science Society, Savoy, IL, USA. ISBN: 978- 956-14-2161-5
- Febles Fernández, C., Soto Febles, C., Saldaña Bernabeu, A., & García Triana, B. E. (2002). Funciones de la vitamina E: actualización. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(1), 28-32.
- Fraire-Cordero, S., Pró-Martínez, A., Ramírez-Valverde, G., Sánchez-del Real, C., & Gallegos-Sánchez, J. (2013). Selenio y vitamina E en la fertilidad de ovejas pelibuey sincronizadas con progesterona. *Universidad y ciencia*, 29(1), 33-44.
- Granja, Y. T., Cerquera, J., & Fernández, O. (2012). Factores nutricionales que interfieren en el desempeño reproductivo de la hembra bovina. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 4(2), 458-472.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2007). Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-hill. NO SE PUEDE DESCARGAR EL LIBRO
- Handel, I., Watt, K. A., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., Macrae, A., Scott, P., ... & Mellanby, R. J. (2016). Vitamin D status predicts reproductive fitness in a wild sheep population. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Handel, I., Watt, K. A., Pilkington, J. G., Pemberton, J. M., Macrae, A., Scott, P., ... & Mellanby, R. J. (2016). Vitamin D status predicts reproductive fitness in a wild sheep population. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- Hogarth, C. A., & Griswold, M. D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), 956-962.
- Hoskins, AA y Moore, MJ (2012). El espliceosoma: una máquina macromolecular flexible y reversible. *Tendencias en ciencias bioquímicas*, 37 (5), 179-188.
- Izquierdo, A. C., Lang, C. G. R., Jiménez, C. A. C., Jiménez, M. S. C., Liera, J. E. G., Denis, B. E. R., & Salinas, K. A. (2009). ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES EN LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA/OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANTS IN THE SPERMATIC CONSERVATION. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 1
- Jensen, MB (2012). Metabolismo de la vitamina D, hormonas sexuales y función reproductiva masculina. *Reproducción*, 144 (2), 135-152.
- Kendall, N. R., McMullen, S., Green, A., & Rodway, R. G. (2000). The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science*, 62(4), 277-283.
- Kumar, D., Salian, S. R., Kalthur, G., Uppangala, S., Kumari, S., Challapalli, S., ... & Adiga, S. K. (2013). Semen abnormalities, sperm DNA damage and

- global hypermethylation in health workers occupationally exposed to ionizing radiation. *PLoS One*, 8(7), e69927.
- Liu, S., Masters, D., Ferguson, M., & Thompson, A. (2014). Vitamin E status and reproduction in sheep: potential implications for Australian sheep production. *Animal Production Science*, 54(6), 694-714.
- Liu, S., Masters, D., Ferguson, M., & Thompson, A. (2014). Vitamin E status and reproduction in sheep: potential implications for Australian sheep production. *Animal Production Science*, 54(6), 694-714.
- Mahmoud, G. B., Abdel-Raheem, S. M., & Hussein, H. A. (2013). Effect of combination of vitamin E and selenium injections on reproductive performance and blood parameters of Ossimi rams. *Small Ruminant Research*, 113(1), 103-108.
- Majid, A., Qureshi, M. S., & Khan, R. U. (2015). In vivo adverse effects of alpha-tocopherol on the semen quality of male bucks. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 99(5), 841-846.
- McDowell, L. R., Williams, S. N., Hidiroglou, N., Njeru, C. A., Hill, G. M., Ochoa, L., & Wilkinson, N. S. (1996). Vitamin E supplementation for the ruminant. *Animal Feed Science and Technology*, 60(3-4), 273-296.
- Meléndez, P., & Bartolomé, J. (2017). Avances sobre nutrición y fertilidad en ganado lechero: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 8(4), 407-417.
- Membrillo-Ortega, A., Córdova-Izquierdo, A., Hicks-Gómez, J. J., Valencia-Méndez, J. J., & Castillo-Juárez, H. (2011). Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. *Revista Veterinaria*, 22(2), 85-90.
- NAM. 2002. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Co-produced by the National Academy of Medicine-Mexico and the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 1st ed. Harlan Mexico, DF, Mexico. ISBN: 978-0-309-15400-0.
- O'Hara L, Smith LB. Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015;29(4): 595–605.
- Pitnick, S., Hosken, D. J., & Birkhead, T. R. (2009). Sperm morphological diversity. *Sperm biology*, 69-149.
- Puerta Suárez, J., Carvajal Obando, A., & Cardona Maya, W. D. (2019). Relación entre los antioxidantes y la calidad seminal. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 45(2).
- Ramírez-Bribiesca, J. E., Tórtora, J. L., Huerta, M., Hernández, L. M., López, R., & Crosby, M. M. (2005). Effect of selenium-vitamin E injection in selenium-deficient dairy goats and kids on the Mexican plateau. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(1), 77-84.
- Romero, O., & Bravo, S. (2012). Alimentación y nutrición en los ovinos. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*.
- Singh, A. K., Rajak, S. K., Kumar, P., Kerketta, S., & Yogi, R. K. (2018). Nutrition and bull fertility: A review. *J. Entomol. Zool. Stud*, 6(6), 635-643.
- Talib Ali, A. B., Bomboi, G., & Floris, B. (2009). Does Vitamin E or Vitamin E plus Selenium improve reproductive performance of rams during hot weather?. *Italian Journal of Animal Science*, 8(4), 743-754.

- Talib Ali, A. B., Bomboi, G., & Floris, B. (2009). Does Vitamin E or Vitamin E plus Selenium improve reproductive performance of rams during hot weather?. *Italian Journal of Animal Science*, 8(4), 743-754.
- Van Meter, DC y Callan, RJ (2001). Selenio y vitamina E. *Clínicas veterinarias de América del Norte: Práctica de animales alimentarios* , 17 (2), 373-402.
- Van Metre, D. C., & Callan, R. J. (2001). Selenium and vitamin E. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(2), 373-402.
- Yang, B., Sun, H., Wan, Y., Wang, H., Qin, W., Yang, L., ... & Yao, B. (2012). Associations between testosterone, bone mineral density, vitamin D and semen quality in fertile and infertile Chinese men. *International journal of andrology*, 35(6), 783-792.
- Yao, X., Ei-Samahy, M. A., Yang, H., Feng, X., Li, F., Meng, F., ... & Wang, F. (2018). Age-associated expression of vitamin D receptor and vitamin D-metabolizing enzymes in the male reproductive tract and sperm of Hu sheep. *Animal reproduction science*, 190, 27-38.
- Yue, D., Yan, L., Luo, H., Xu, X., & Jin, X. (2010). Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 217-222.
- Yue, D., Yan, L., Luo, H., Xu, X., & Jin, X. (2010). Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 217-222.
- Zhou, J., Du, J., Huang, L., Wang, Y., Shi, Y., & Lin, H. (2018). Preventive effects of vitamin D on seasonal influenza A in infants: a multicenter, randomized, open, controlled clinical trial. *The Pediatric infectious disease journal*, 37(8), 749-754.
- Zhou, P., McEvoy, T. G., Gill, A. C., Lambe, N. R., Morgan-Davies, C. R., Hurst, E., ... & Mellanby, R. J. (2019). Investigation of relationship between vitamin D status and reproductive fitness in Scottish hill sheep. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Zubair, M. (2017). Effects of dietary vitamin E on male reproductive system. *Asian pacific journal of reproduction*, 6(4), 145.
- Zubair, M., Ali, M., Ahmad, M., Sajid, S. M., Ahmad, I., & Gul, S. T. (2015). Effect of Selenium and Vitamin E on cryopreservation of semen and reproductive performance of animals (a review). *J. Entomol. Zool. Studies*, 3(1), 82-86.