

Informe De Pasantía profesional

Jesús David Forero Hernández

Programa de Medicina Veterinaria, Universidad de Pamplona

M.V. PhD Johanna Margreth Fonseca Matheus

Junio 02, 2023

Notas de Autor

La correspondencia relacionada con este documento deberá ser enviada a:

forerodh290@gmail.com ; jesus.forero@unipamplona.edu.co

Tabla de contenido

Introducción	6
Descripción del sitio de práctica	7
Actividades desarrolladas durante la pasantía	9
Determinación de los niveles de malondialdehído en semen fresco bovino mediante el método TBARS inducido y su relación con los parámetros seminales.	10
Resumen.....	10
Palabras claves:.....	10
Summary	11
keywords	11
Capítulo I	12
Planteamiento del problema.....	12
Justificación	13
Objetivos.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
Capítulo II	15
Introducción	15
Revisión de literatura	17
Parámetros seminales.....	17

Especies reactivas del oxígeno (ROS)	19
Peroxidación lipídica	22
Capítulo III.....	24
Metodología	24
Concentración y vigor.....	25
Integridad de membrana plasmática	26
Análisis espermático asistido por computadora.....	26
Análisis de la peroxidación lipídica.....	26
Capítulo IV	27
Análisis estadístico	27
Discusión	28
Capítulo VI	31
Conclusiones.....	31
Recomendaciones	31
Referencias bibliográficas.....	32
Anexos	40

Lista de figuras

Figura 1	7
Figura 2	7
Figura 3	19
Figura 4	21
Figura 5	21
<i>Mecanismos de interacción en el papel del estrés oxidativo.....</i>	21
Figura 6	23
Figura 7	23
Figura 8	40
<i>Análisis integridad de membrana espermática</i>	40
Figura 9	40
<i>Muestra de proceso de peroxidación lipídica inducida.....</i>	40
Figura 10	41
<i>Actividades y personal departamento de reproducción UNESP</i>	41

Lista de tablas

Tabla 1	28
<i>Resultados (média $\pm$ desviación estándar) del análisis de semen fresco de 14 toros Nelore de alta y baja fertilidad en vivo.</i>	<i>28</i>

Introducción

El médico veterinario asume la responsabilidad de tener autonomía a la hora de tomar decisiones, por este motivo debe ser una persona íntegra, culta y que a su vez inspire confianza. En efecto, la medicina veterinaria es un boceto cual terminado llegase a tener una perfecta sincronía con la vida, dicho lo anterior, un médico veterinario tiene que ser una persona multidisciplinaria capaz de afrontar diversas situaciones y que de las mismas salga triunfante. En otras palabras, el médico veterinario está encargado de velar por la salud y bienestar de la vida tanto humana como animal.

La Universidad de Pamplona en su carrera de Medicina Veterinaria brinda entornos que facilitan a sus estudiantes conocer el funcionamiento del abordaje médico en cada una de sus especies, puesto que se sabe es una disciplina multidisciplinar que contribuye significativamente a la formación de médicos veterinarios capaces de afrontar cualquier situación, es decir, ofrece grandes espacios para que el estudiante realice su pasantía y finalice exitosamente su carrera profesional.

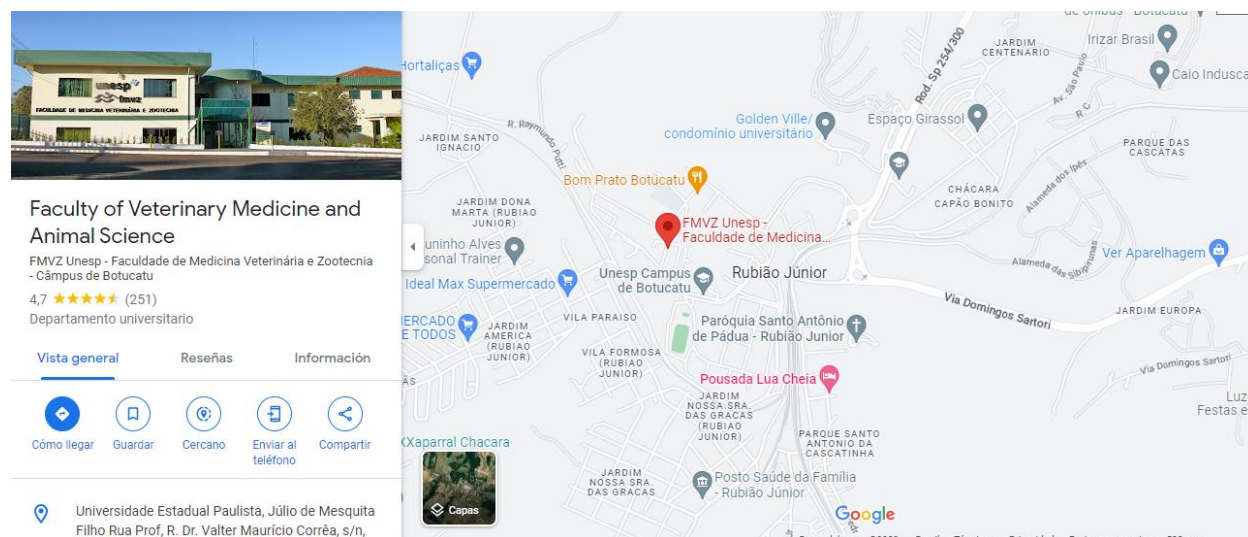
Mencionado lo anterior, se brinda la información pertinente desde un principio hasta su respectiva culminación del proceso llevado a cabo por un estudiante cursando pasantía profesional en la Universidad Estatal Paulista “Julio De Mesquita Filho” facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, campus Botucatu (departamento de cirugía veterinaria y reproducción animal).

Descripción del sitio de práctica

La Universidad Estatal Paulista “Julio De Mesquita Filho” establecida en 1973, cuenta con 24 campus distribuidos a lo largo de toda la ciudad de Sao Paulo-Brasil. Por consiguiente, se realiza la pasantía profesional en la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – campus de Botucatu la cual está ubicada en el campus Rubião Jr. Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n - Rubião Jr. - Botucatu/SP (Figura 1). Este campo cuenta con un hospital veterinario dividido en 4 departamentos (clínica veterinaria, mejora y nutrición animal, cirugía veterinaria y reproducción animal y producción animal y medicina veterinaria preventiva).

Figura 1

Ubicación facultad de medicina veterinaria y zootecnia (UNESP)



Nota. Campus de Botucatu-UNESP. Fuente: Google maps (2023).

El departamento de cirugía veterinaria y reproducción animal cuenta con excelentes instalaciones, un equipo veterinario altamente cualificado, personal capacitado para auxiliar en caso de cualquier eventualidad. Hay que hacer notar, que el funcionamiento del mismo está orientado en brindar atendimento medico a animales con alteraciones de índole reproductivo o

todo lo que se relacione con ello, es así, que cualquier paciente con algún cuadro clínico distinto al mencionado anteriormente será remitido hacia otro departamento. Sus instalaciones de trabajo están ordenadas de tal manera que permita una atención eficiente tanto para pequeñas como grandes especies (Figura 2). No obstante, todo su funcionamiento está orientado estrictamente y en gran medida a la atención ambulatoria.

Figura 2

Instalaciones departamento de reproducción



Nota. En la imagen se evidencia A: sala de cirugía de pequeñas especies. B: sala de atención médica pequeñas especies. C: instalaciones grandes especies. D: laboratorios de biotecnología de la reproducción. Fuente: Forero (2023).

Actividades desarrolladas durante la pasantía

Las actividades realizadas durante la pasantía en la Universidad Estatal Paulista “Julio De Mesquita Filho” UNESP campus Botucatu, se rigen bajo la atención medica ambulatoria, es decir, que la rutina depende del número de casos que se presenten. Cabe mencionar, que el departamento se divide en 3 áreas, consulta para pequeñas especies, cirugía y neonatología de pequeñas especies y cirugía y atendimento de grandes especies, mencionado lo anterior, el pasante tiene que durar una semana por área, así mismo, cumplir con 8 horas diarias a excepción del área de cirugía y en lo que refiere al fin de semana, este tiene que cumplir por lo menos con un fin de semana por mes.

Por otro lado, se brinda asistencia al médico veterinario a cargo en intervenciones quirúrgicas, diagnósticos de gestación, exámenes de la calidad espermática, instaurar tratamientos, inseminaciones artificiales, atención ambulatoria, toma de muestras, entre otras. De igual modo, si se llegase a requerir la intervención del equipo profesional en otro departamento se tiene que estar a plena disposición para brindar acompañamiento. Además, se hace participe de reuniones y clases al inicio de cada jornada con el objetivo de adquirir mayores conocimientos.

Determinación de los niveles de malondialdehído en semen fresco bovino mediante el método TBARS inducido y su relación con los parámetros seminales.

Resumen

En el presente estudio se planteó evaluar la concentración de malondialdehído mediante el método de sustancias radioactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y cómo se relaciona esta con los parámetros seminales en 14 muestras de semen fresco bovino, el grupo de estudio en su mayoría fue toros de raza Nelore, las muestras se recolectaron por vagina artificial, para su respectivo análisis se realizaron las pruebas de tinción Eosina-Nigrosina, conteo en cámara de Neubauer, análisis espermático asistido por computadora (CASA) y el método TBARS. La peroxidación lipídica espermática se indujo mediante la adición de sulfato de hierro + ácido ascórbico y se determinó su concentración mediante espectrofotómetro (UV-Vis de micro volumen Thermo Scientific™ NanoDrop™ One C) a una longitud de onda de 532 nm. Encontrándose, que los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en semen fresco, basados en la medición de TBARS, no están relacionados con la fertilidad de machos reproductores bovinos, dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los animales con buena y mala fertilidad. no obstante, se plantea que la medición de la concentración de malondialdehído mediante el método TBARS en corto tiempo no arroja valores de relevancia para su análisis.

Palabras claves:

Estrés oxidativo, lipoperoxidación, Nelore.

Summary

In the present study, it was proposed to evaluate the concentration of malondialdehyde by means of the method of radioactive substances to thiobarbituric acid (TBARS) and how it is related to seminal parameters in 14 samples of fresh bovine semen, the study group was mostly bulls of Nelore breed, the samples were collected by artificial vagina, for their respective analysis the Eosin-Nigrosin staining tests, Neubauer chamber count, computer-assisted sperm analysis (CASA) and the TBARS method were performed. Sperm lipid peroxidation was induced by adding iron sulfate + ascorbic acid and its concentration was determined by spectrophotometer (Thermo Scientific™ NanoDrop™ One C micro-volume UV-Vis) at a wavelength of 532 nm. It was found that the levels of reactive oxygen species (ROS) in fresh semen, based on the TBARS measurement, are not related to the fertility of bovine reproductive males, since no statistically significant differences were observed ($P > 0.05$). between animals with good and poor fertility. however, it is suggested that the measurement of malondialdehyde concentration using the TBARS method in a short time does not yield relevant values for its analysis.

keywords

Oxidative stress, lipid peroxidation, Nelore.

Capítulo I

Planteamiento del problema

Conocer la fertilidad de un toro y/o su capacidad fecundante es un factor de alta relevancia en reproducción bovina. Con el intuito de predecir la fertilidad del toro o la calidad de sus espermatozoides, varias son las pruebas realizadas. Entre ellas encontramos las de rutina como: motilidad, vigor, concentración, morfología espermática e integridad de membrana.

Los espermatozoides una vez ingresan al tracto reproductivo femenino deben capacitarse para conseguir fecundar el gameto femenino. Durante esta capacitación, se ha demostrado que los ROS de una manera fisiológica y controlada, juegan un papel fundamental en este proceso. Sin embargo, fallas en entre la producción de ROS y la capacidad del sistema biológico para neutralizarlos puede provocar que los ROS dañen la membrana espermática, reduciendo la motilidad y habilidad de fusionarse con el oocito o incluso alteren la integridad del ADN del espermatozoide. Por este motivo el objetivo o la hipótesis del presente trabajo es medir la concentración de malondialdehído y sus posibles efectos sobre los parámetros seminales del semen fresco de toros con mayor y menor fertilidad.

Justificación

La constante búsqueda por comprender y determinar cuáles podrían ser las posibles causas de déficit en la calidad espermática o tasas de preñez muy bajas han hecho optar por incursionar en nuevos estudios que permitan validar alternativas idóneas para interpretar aquellas fallas, aunque, no es del todo sencillo ya que estas alternativas requieren equipos de vanguardia y excelente conocimiento.

La presente investigación nace de la idea de brindar y obtener información del proceso por el cual la peroxidación lipídica causa daño al espermatozoide y sus complicaciones en la reproducción, así mismo, de las técnicas y proceso desarrollado para medir dicho daño, debido a que fallas en conocer lo mencionado acarrearán consigo grandes pérdidas al sector pecuario, además, se pretende que esta sea de gran ayuda para futuras investigaciones. En efecto, el presente estudio tiene por objetivo determinar los niveles de malondialdehído en semen fresco bovino mediante el método TBARS inducido y su relación con los parámetros seminales.

Objetivos

Objetivo general

Medir la concentración de malondialdehído y sus posibles efectos sobre los parámetros seminales del semen fresco de toros con mayor y menor fertilidad.

Objetivos específicos

- Interpretar la cantidad de malondialdehído mediante espectrofotometría a 532 nm.
- Evaluar la integridad de la membrana espermática.
- Evaluar parámetros seminales concentración, morfología, vigor espermático.

Capítulo II

Introducción

Hoy en día se realizan en su mayoría los mismos exámenes para determinar la calidad espermática (Aitken et al., 2006). En habida cuenta de esta problemática se ofrecen en la actualidad técnicas más avanzadas para determinar más a fondo la calidad espermática, como lo es el análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA), sondas fluorescentes combinadas con citometría de flujo y pruebas bioquímicas (Gliozzi et al., 2017). Estas últimas son puestas en práctica debido a la escasa atención que se brinda a la función fisiológica o marcadores de fertilidad, dicho en otras palabras, antioxidantes o proteínas en sangre y el plasma seminal (Kumar et al., 2015).

Los espermatozoides en sus fosfolípidos de membrana contienen elevados niveles de ácidos grasos poliinsaturados por consiguiente tienden a tener una capacidad antioxidante relativamente baja lo cual los hace vulnerables a las lesiones que se puedan inducir por parte de las elevadas concentraciones de ROS (Žura Žaja et al., 2016). Los ROS al generar lesión en el espermatozoide generan daños a lípidos, proteínas, carbohidratos, material genético y alteración al citoesqueleto, lo cual se traduce en una pérdida irreversible de la motilidad espermática (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992). Por ende, se llegan a observar niveles significativos de peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ADN (Amrit Kaur Bansal & Bilaspuri, 2011).

El estado oxidativo del espermatozoide se mantiene mediante niveles intracelulares y extracelulares compuestos por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Žura Žaja et al., 2016), puesto que los antioxidantes son el principal mecanismo de defensa contra los radicales producto del estrés oxidativo (Sikka, 1996). Cabe señalar que la cuantificación del estrés

oxidativo detectando ROS y otros radicales libres es difícil porque son moléculas con una vida relativamente corta y muy reactivas de manera no específica. En efecto, el daño en curso se analiza midiendo el contenido de productos de oxidación secundarios, incluidos los derivados de aminoácidos/proteínas, como el contenido de carbonilo de proteínas (PCC), los ácidos nucleicos y la peroxidación lipídica (como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), o la evaluación de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Žaja et al., 2016).

La peroxidación lipídica producto de la interacción de los radicales libres se considera indicado para el estudio de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Tremellen, 2008). El método TBARS, es una herramienta simple que permite monitorear dicho daño (Tremellen, 2008). Por ello, en este estudio se pretende evaluar la peroxidación lipídica y sus posibles efectos en los parámetros seminales del semen fresco de toros con mayor y menor fertilidad mediante el método TBARS.

Revisión de literatura

Parámetros seminales

Es importante mencionar que el espermatozoide no es más que una célula que presenta una motilidad activa, compuesto por una cabeza en donde se ubica el núcleo haploide cubierto por el acrosoma, así mismo, una cola o flagelo el cual está completamente envuelto por una membrana citoplasmática (Freitas, 2008). En la (Figura 3) se puede evidenciar un esquema del espermatozoide bovino y sus respectivas partes (cabeza, parte intermedia y cola), brevemente, la cabeza del espermatozoide tiene la finalidad de almacenar material genético, además, está constituida por un acrosoma que cumple la función de contener glicoproteínas y enzimas que favorecen la penetración al ovocito durante la fecundación. Por otro lado, la parte intermedia provee energía necesaria para la propulsión del espermatozoide (Freitas, 2008). Por consiguiente, los aspectos que se evalúan constantemente para determinar e interpretar la calidad espermática son los aspectos macroscópicos como: volumen/aspecto/olor, color y pH y microscópicos como concentración, motilidad masal, motilidad/vigor, morfología, viabilidad e integridad de membrana (Aitken et al., 2006).

El volumen eyaculado varía de acuerdo a la edad, raza y método de colecta, su apariencia al examen visual tiene que ser cremosa a lechosa con un olor característico a yema de huevo, no obstante, cambios en estas tonalidades son indicativos de procesos infecciosos, polispermia, azoospermia (Freitas, 2008). En lo que respecta a la concentración, es la cantidad de espermatozoides presentes en un determinado volumen de eyaculado que varía principalmente dependiendo del método de colecta, la cual se determina utilizando espectrofotometría, contador de células computarizado o el método más usado, la cámara de Neubauer (Freitas, 2008). Por otro lado, la motilidad es uno de los parámetros fundamentales al momento de evaluar la calidad

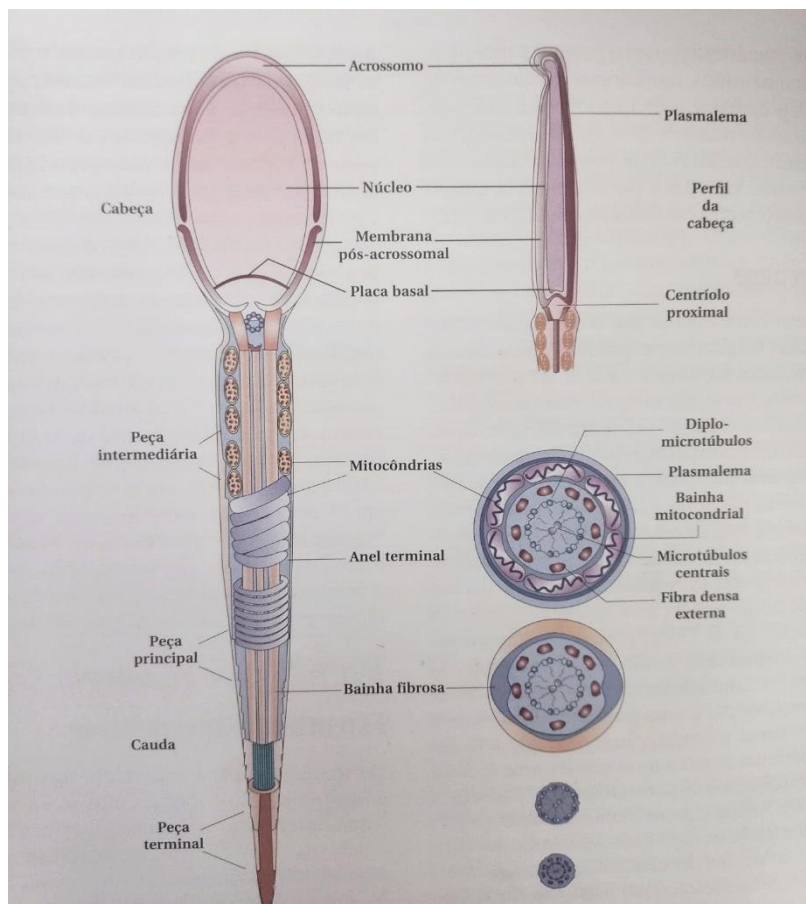
espermática, esta se puede medir como motilidad total, dada en (%) total de espermatozoides que presentan movilidad en la muestra, motilidad progresiva, motilidad en masa evaluada mediante el examen visual o en microscopia a razón de 10 a 20 x y estimada bajo resultados de 0 a 5 (Freitas, 2008).

En síntesis, la motilidad es la manifestación y la integridad celular que tienen los espermatozoides (Holt & Van Look, 2004). Sobre la integridad de membrana o proporción de espermatozoides vivos, se utilizan diferentes técnicas de tinción, entre las que están: el rojo congo, el azul de bromofenol, el fast-green y por último la tinción eosina-nigrosina (Freitas, 2008). Esta se evalúa utilizando la tinción Eosina-Nigrosina a una proporción de 1:1. Su finalidad, se basa en la permeabilidad de membrana, en efecto, la eosina penetra la célula tiñéndola de rosa, aquellos espermatozoides que tienen la membrana intacta estarán incoloros y contrastan con el fondo teñido por la Nigrosina (Barth & Oko, 1989).

No obstante, al día de hoy se implementa el análisis CASA, la finalidad del examen se basa en la adquisición de imágenes de 60 Hz cuadros/seg, con un mínimo de 80 celdas por campo, un tamaño mínimo de celda de cinco píxeles, 70 para la intensidad de celda, velocidad de trayectoria de 50 μ /s y índice de rectitud (STR) del 70% para células progresivas y velocidad media (VAP) y velocidad rectilínea (VSL) cutoff a 30 y 15 μ /s para células lentas.

Figura 3

Estructura del espermatozoide bovino



Nota. Partes del espermatozoide bovino. Fuente: (Freitas, 2008).

Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Históricamente, los primeros estudios acerca del estrés oxidativo y de cómo podía afectar la viabilidad y función del espermatozoide se llevaron a cabo incubando espermatozoides humanos en elevadas concentraciones de O_2 , en donde, se observaba como estos perdían rápidamente su motilidad, al mismo tiempo, si se adicionaba catalasa estos disminuían esas pérdidas (MacLeod, 1943). Por otro lado, también se validó que el estrés oxidativo conduce a un daño celular mediado por el oxígeno y oxidantes derivados del mismo (Sikka, 1996). No obstante, se entiende que el espermatozoide como célula aeróbica, debe ser resistente a niveles

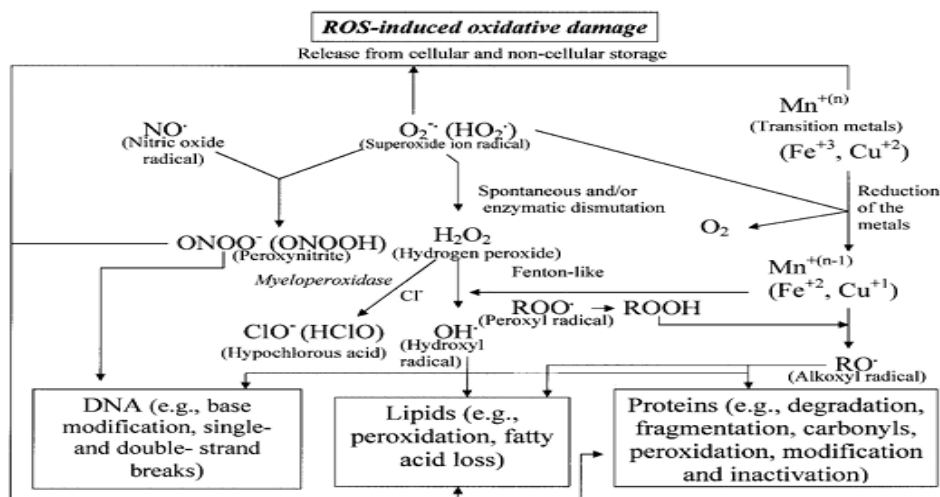
tóxicos de ROS generados por su propio metabolismo (O'Flaherty, 2014); sin embargo, no se tiene completa claridad del proceso bioquímico que conduce a la formación de ROS por parte del espermatozoide (MAIA & em, 2009).

Un desbalance entre la generación de ROS y la actividad antioxidante es perjudicial para los espermatozoides y está asociado con la infertilidad (Sharma & Agarwal, 1996). Dado que los ROS desempeñan funciones importantes en procesos tales como: capacitación del espermatozoide, motilidad y mantenimiento (Desai et al., 2009), fluidez de membrana (Majić Balić et al., 2012). En otras palabras, la membrana de los espermatozoides de mamíferos son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, por ende, son sensibles al daño inducido por oxígeno mediado por la peroxidación de lípidos, por lo tanto, son vulnerables al ataque de ROS que resulta en una disminución de la motilidad de los espermatozoides, aparentemente debido a una pérdida rápida de ATP intracelular que conduce a daño axonemal, disminución de la viabilidad de los espermatozoides y aumento de los defectos morfológicos de los espermatozoides en la pieza intermedia con efectos nocivos sobre la capacitación de los espermatozoides y la reacción del acrosoma (A. K. Bansal & Bilaspuri, 2018). Los ácidos grasos están conformados por cadenas de átomos de carbono unidos por enlaces de hidrógeno por un grupo carboxilo terminal (COOH). Los ROS actúan oxidando los enlaces carbono-hidrógeno en el grupo metilo adyacente al doble enlace, y posterior a ello, el proceso iniciado muda a un proceso completamente autocatalítico denominado peroxidación lipídica (Dix & Aikens, 1993). De acuerdo a lo anterior, el daño al espermatozoide se produce por una alteración en el sistema antioxidante, que lleva consigo a un déficit y en consecuencia a un aumento de ROS. En resumidas cuentas, se puede evidenciar en la (Figura 4 y 5) el proceso por el cual se induce daño oxidativo mediado por los

ROS y como estos desencadenan la baja tasa de fertilidad que se sintetiza en grave daño que causa al espermatozoide (Kohen & Nyska, 2002; Majić Balić et al., 2012).

Figura 4

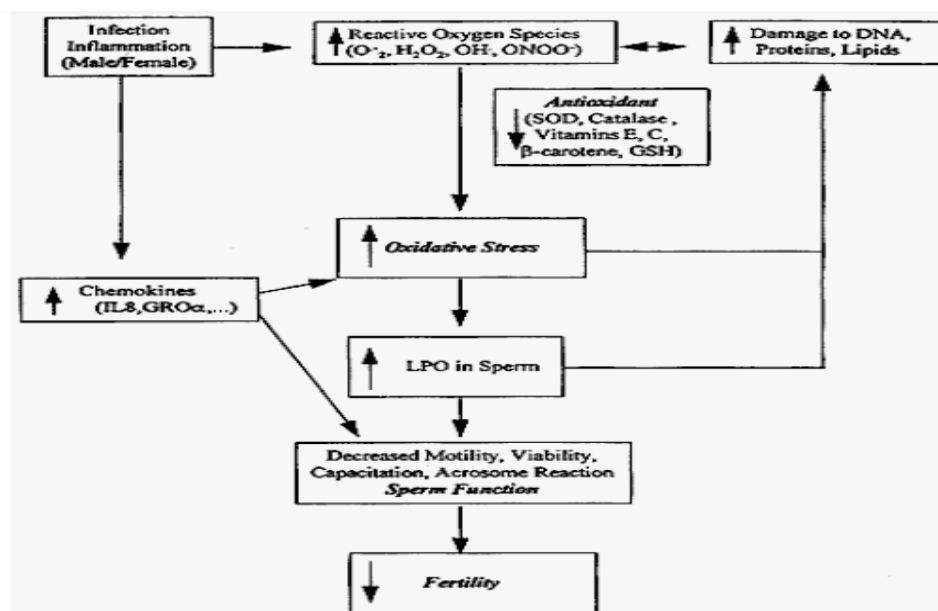
Daño inducido por las especies reactivas de oxígeno



Nota. Tipos de ROS que participan en el proceso de daño oxidativo. Fuente: (Kohen & Nyska, 2002).

Figura 5

Mecanismos de interacción en el papel del estrés oxidativo



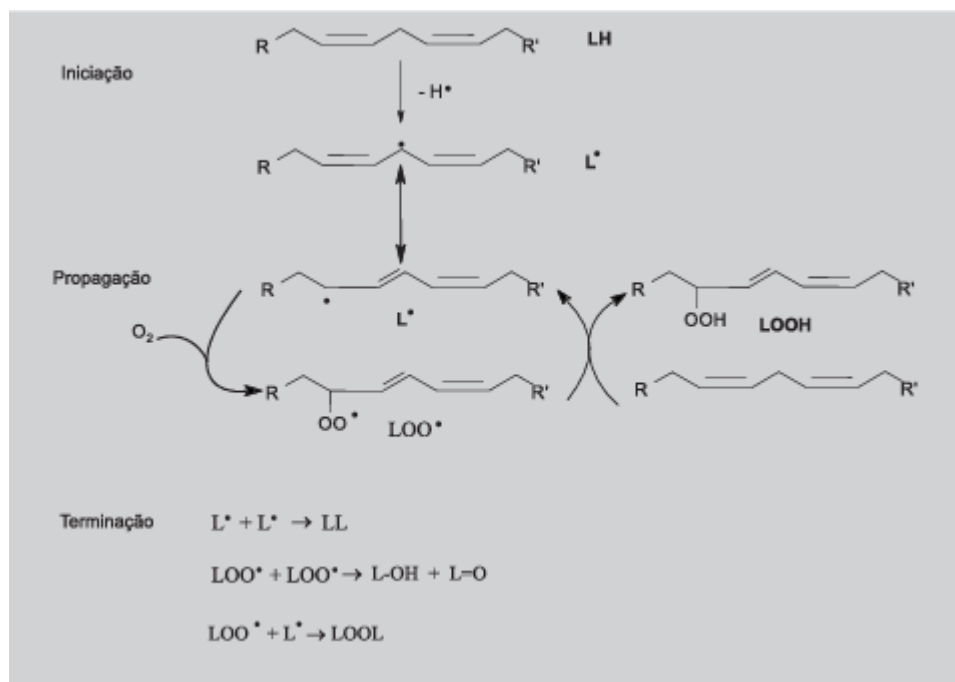
Nota. Estrés oxidativo y como este afecta la fertilidad. Fuente: (Majić Balić et al., 2012).

Peroxidación lipídica

El mecanismo de daño de los ROS hacia el espermatozoide desencadena la oxidación de lípidos que da lugar a la cascada de peroxidación lipídica (Sharma & Agarwal, 1996). Este es un proceso de degradación autocatalítica de la membrana plasmática (Halliwell et al., 1993). En efecto, la peroxidación consiste en la unión de oxígeno molecular a un ácido graso poliinsaturado (PUFA) para elaborar un hidroperóxido lipídico (LOOH), este proceso ocurre en tres etapas y tiene consigo numerosas alternativas de reacciones químicas (Figura 6), dificultando su análisis e interpretación (Lima & Abdalla, 2001). Es decir, es un proceso por el cual se genera pérdida de la integridad de la membrana y su morfológica, degradación de las funciones celulares, pérdida de la motilidad de los espermatozoides y la inducción de la apoptosis (Bucak et al., 2010). Puede ocurrir principalmente a través de dos vías: la primera es una vía enzimática que está muy ligada al ácido graso, en donde se involucran las ciclooxygenasas y lipooxygenasas, la segunda, una vía no enzimática que combina la participación de los ROS en conjunto con metales de transición (Porter et al., 1995). Los productos de la peroxidación, peróxidos lipídicos, se generan espontáneamente en la membrana plasmática del espermatozoide, y es así, que por acción de la fosfolipasa A 2 son liberados e inducen daño en el ADN y disminución de la fertilidad, en especial durante el almacenamiento (Twigg et al., 1998).

Figura 6

Proceso de peroxidación lipídica



Nota. Principales reacciones que ocurren durante el proceso de peroxidación lipídica.
Fuente: (Lima & Abdalla, 2001).

Para medir la peroxidación lipídica existen métodos tales como; la detención de dienos conjugados, cuya metodología consiste en identificar por absorción UV entre 230 y 235 nm la formación de hidroperóxidos de dienos conjugados (Haliawell et al., 1999). La detención de 4-hidroxinonenal, la cromatografía líquida de alta resolución con detección de quimioluminiscencia (Mashima et al., 2000), la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (Stewart, 1999), la prueba de naranja de xilenol (Gay et al., 1999), la detención de isoprostanos (Lawson et al., 1999) y, por último, la reacción al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

El método más utilizado hoy en día para evaluar la peroxidación lipídica del espermatozoide de un mamífero es la reacción al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Domínguez-Rebolledo et al., 2010), durante la fase de iniciación de la cascada de peroxidación, los denominados hidróxidos lipídicos se acumulan en la membrana espermática que se tiende a

descomponer formando varios aldehídos, entre ellos, destaca el malondialdehído, producto que se mide mediante el método TBARS (Sanocka & Kurpisz, 2004).

El malondialdehído (MDA) producto de la peroxidación lipídica, es un dialdeído formado como subproducto del proceso de oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, es un ácido moderadamente débil y de bajo peso molecular, su interacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA) forman productos que se pueden interpretar por absorción visible (532 nm) o bien sea por fluorescencia (ve 515 nm y -553 nm), además, participa fácilmente en la reacción de adición nucleófila con ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), generando un aducto rojo fluorescente 1:2 MDA:TBA. Lo mencionado anteriormente, junto con la disponibilidad de métodos fáciles y sensibles para cuantificar MDA, han llevado al uso rutinario de la determinación de MDA y en especial la prueba TBARS para detectar y cuantificar la peroxidación lipídica (Janero, 1990).

Capítulo III

Metodología

En el presente estudio se analizaron 14 muestras de semen bovino colectadas por vagina artificial clasificadas en grupos de buena y mala fertilidad según resultados de IATF, provenientes de la central de colecta y procesamiento de semen Central Bela Vista, ubicada en Chacara de Recreio Jardim Alvorada, Botucatu – estado de São Paulo. Los animales seleccionados son mantenidos bajo un sistema de estabulación, condición corporal 4 / 5, en su mayoría son de raza Nelore, colectados dos veces al día. Todos los procedimientos de análisis de

semen fueron llevados a cabo en los laboratorios de reproducción del departamento de cirugía veterinaria y reproducción animal FMVZ- UNESP - campus de Botucatu.

La evaluación de la calidad espermática se llevó a cabo implementando las técnicas, 1: Recuento en cámara de Neubauer. 2: Tinción Eosina-Nigrosina, su finalidad se basa en la penetración de la membrana espermática por parte de la eosina, las cuales se van a teñir de rosa, siendo este el indicativo de célula no viable, al mismo tiempo la nigrosina proporcionará un fondo oscuro que facilita identificar las células viables y no viables, su resultado será expresado en porcentaje teniendo como margen de análisis 100 células (Hopper, 2021). 3: Análisis espermático asistido por computadora, técnica ampliamente usada en los laboratorios de reproducción asistida para llevar a cabo evaluaciones de las características y la calidad de los espermatozoides, permite una evaluación objetiva de diferentes características como lo son: movimiento, velocidad, morfología, concentración (Verstegen et al., 2002). 4: Método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, aquí se evalúa los niveles de malondialdehído, el cual es un producto de la peroxidación lipídica. La técnica consiste en que dos moléculas de ácido tiobarbitúrico reaccionen con una molécula de malondialdehído, para producir complejo de color rosa, el cual se mide espectrofotométricamente a 532 nm (Dos Santos Hamilton et al., 2016). Los datos se analizaron utilizando el software SIGMAPLOT® Exact Graphs for Exact Science.

Concentración y vigor

En un micro tubo se diluyen a razón de 1:10 (5 μ L de semen + 45 μ L de formol salino) para su posterior recuento en cámara de Neubauer. Cabe mencionar, que se evalúa de igual manera por el sistema computarizado CASA. El vigor se evalúa de igual forma bajo microscopio.

Integridad de membrana plasmática

Se realiza un frotis a razón de 1:1 en portaobjetos para su posterior análisis en microscopio convencional en escala de 100x, donde se toma como muestra representativa 100 espermatozoides de cada lámina.

Análisis espermático asistido por computadora

Se insertó una alícuota (3 μ L) de cada muestra en una cámara de recuento Leja previamente calentada a 37 °C y se seleccionaron al menos 1000 células en un mínimo de seis campos por muestra para el análisis. Estos análisis se llevaron a cabo mediante el procedimiento de equipo (Goovaerts et al., 2006), y su resultado se basó en la interpretación del total de motilidad expresado en porcentaje (%).

Análisis de la peroxidación lipídica

Se analizaron las muestras utilizando el método de TBARS inducido adaptado por (M. Nichi et al., 2006) con algunas modificaciones. En primer lugar, en un micro tubo se adiciona 100 μ L de semen, luego se adiciona 1:100 μ L de solución fosfato buferada (PBS), se centrifuga a 800 G por 10 minutos, al terminar se retira el sobrenadante y se vuelve a adicionar la misma cantidad de PBS, este procedimiento se repite 3 veces, una vez finalizado se adiciona 100 μ L de PBS a la muestra. Seguidamente, se prepara una solución de sulfato de Fe (0,006 g / 5 ml de agua Milli-Q) y ascorbato (0,02 g / 5 ml de agua Milli-Q), teniendo listas las soluciones, se adicionan 25 μ L de cada una en el tubo *Eppendorf*. Se incuba a 37 °C por 90 minutos con el tubo abierto. Una vez realizado lo mencionado previamente, se procede a adicionar ácido tricloroacético (TCA 10%) en una proporción de 150 μ L de solución + 300 μ L de TCA. Finalizado este procedimiento, se centrifuga a 19.700 G / 10 minutos, al terminar se recupera solamente el sobrenadante, transfiriendo este a un nuevo tubo.

En segundo lugar, al recuperar el sobrenadante se adiciona TBA 1 % (ácido tiobarbitúrico) en una proporción de 1:2 (450 μ L), luego, se incuba a 95 °C por 15 minutos con el tubo cerrado, cabe señalar, que una vez terminado de centrifugar las muestras se deben colocar en hielo para así frenar la reacción. En tercer lugar, la cuantificación de TBARS se realiza por espectrofotómetro (UV-Vis de micro volumen Thermo Scientific™ NanoDrop™ One C) a una longitud de onda de 532 nm. Es importante tener conocimiento acerca de la concentración dado que los resultados serán arrojados en mg de TBARS/10⁶.

Capítulo IV

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SIGMAPLOT® Exact Graphs for Exact Science mediante la prueba la prueba T de student, considerando estadísticamente significativo los valores de $P < 0,05$.

Las concentraciones de la peroxidación lipídica en muestras de semen fresco colectadas de animales de buena y mala fertilidad no presentaron diferencia estadística ($P > 0,05$). No obstante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos con respecto a la motilidad, concentración espermática e integridad de membrana ($P < 0,05$). En lo que refiere, el grupo de vigor no presentó disimilitud ($P > 0,05$).

Tabla 1

Resultados (média $\pm$ desviación estándar) del análisis de semen fresco de 14 toros Nelore de alta y baja fertilidad en vivo.

	Alta fertilidad	Baja fertilidad	
Características espermáticas	(n = 6)	(n = 8)	Valor p*
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
Motilidad (%)	81,3 $\pm$ 5,4	65,1 $\pm$ 15,2	0,015
Vigor (0 – 5)	4,2 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 1,4	0,084
Concentración ($\times 10^6$ /mL)	177,3 $\pm$ 66,0	106,4 $\pm$ 51,1	0,021
Células con membrana íntegra (%)	47,0 $\pm$ 16,3	28,0 $\pm$ 21,3	0,042
TBARs/ $\times 10^8$ espermatozoides	0,7 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,4	0,160

*Prueba t, con $P < 0,05$ significativo.

Discusión

La formación de ROS es un proceso que ocurre de manera progresiva, se ha reportado que causa daños que afectan la fertilidad del semen durante el almacenamiento, cierto grado de peroxidación lipídica es necesario para que ocurra la capacitación espermática, pero cuando ésta aumenta causa daños que reducen la fertilidad del semen conservado (Sawyer, Mercer, Wiklendt, & Aitken, 2003). Dado que la medición de ROS (malondialdehído) se realizó en el semen fresco, es probable que en este momento la cantidad de ROS no fuese suficiente para causar daños que

afectarán la fertilidad del mismo, por lo que se puede inferir que estos niveles no están directamente relacionados con la fertilidad de los reproductores bovinos. El análisis estadístico de los resultados demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de animales estudiados, lo que permite afirmar que para este estudio en semen fresco los niveles de ROS no están asociados con la fertilidad. Si analizamos la literatura reportada, la mayoría de los trabajos se enfoca en el análisis del efecto de los ROS en semen conservado (Maciej Serda et al., 2008; Tiwari et al., 2022; Franciscato, 2015), debido a que la formación de estas sustancias requiere tiempo y se asocia con el proceso degenerativo que sufren los espermatozoides en su membrana durante el almacenamiento (Twigg et al., 1998; Bucak et al., 2010), sumado a ello, el semen fresco es resistente a la peroxidación lipídica, dado que, tan solo un porcentaje limitado de células arroja daño peroxidativo después de las 24 horas (Brouwers & Gadella, 2003), Por lo anterior, se podría esperar que la cantidad de ROS presente en el semen fresco no sea suficiente para afectar la fertilidad, lo que coincide con los resultados obtenidos. No obstante, se requiere realizar el estudio con un mayor número de animales para poder determinar si realmente estos niveles en el semen fresco no afectan la fertilidad.

Una investigación en la que se compararon las concentraciones de TBARS inducido y espontáneo en muestras seminales frescas y criopreservadas recolectadas de toros de raza Nelore y Simmental demostró que el nivel de TBARS es más elevado en muestras criopreservadas (Maciej Serda et al., 2008), por otro lado, en dos investigaciones realizadas, una de ellas demostró que los búfalos tienden a tener un aumento en las concentraciones de malondialdehído en el intervalo de 0,12 a 24 horas, diferente de la especie bovina en la cual no se logró obtener un aumento mayor, dado esto porque las concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados son mayores en la especie bufalina por ende es más susceptible al ataque de ROS y su mensuración

más rápida (Nair et al., 2006). La otra, demuestra que en semen fresco la peroxidación lipídica es mayor en *B. indicus*, mientras que analizando las mismas muestras previo a una criopreservación se lograron resultados de TBARS mayores en *B.taurus* que *B.indicus* (Visintin et al., 2002). Además, en un estudio reciente se descubrió que los toros *B.taurus* tienden a tener un mayor índice de peroxidación lipídica que los *B.indicus* independientemente de la época del año (Marcilio Nichi, 2004). Lo mencionado anteriormente, hace constatar que una posible causa del por qué no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales con buena y mala fertilidad y su relación con las concentraciones de malondialdehído radicó en el tiempo en que se realizó la medición de las concentraciones de malondialdehído y su posible interacción racial dado que se emplearon razas Nelore y Angus.

En el espermatozoide la peroxidación lipídica ocurre primordialmente en la membrana plasmática, es así, que las concentraciones TBARS al momento de inducir la peroxidación dependen de la concentración espermática (Schöneck et al., 1996). Brevemente, la concentración de TBARS se correlaciona con los bajos niveles de concentración espermática, no obstante, la diferencia en el rango de concentración evidenciado en la Tabla 1, se basa en la diferencia entre animales con buena y baja fertilidad, mas no, en las concentraciones de malondialdehído.

Capítulo VI

Conclusiones

Los niveles de ROS en el semen fresco, basados en la medición de TBARS, no están relacionados con la fertilidad de machos reproductores bovinos, dado que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales con buena y mala fertilidad.

La formación de ROS es un proceso que requiere tiempo, por lo que se espera que sus niveles en el semen fresco no afecten directamente la fertilidad del mismo, contrario a lo que ocurre en el semen conservado.

Es necesario realizar nuevos ensayos en los que se incluya un mayor número de animales para reafirmar lo reportado en el presente estudio.

Recomendaciones

Analizando los resultados del presente estudio, se podría plantear que se puede realizar la determinación de TBARS espontáneo e inducido en semen fresco, estimando patrones de tiempo para realizar el análisis. Así mismo, seleccionar detalladamente animales que presenten una excelente y mala concentración espermática, por otro lado, realizar la inducción de la peroxidación lipídica en semen fresco con dos o más métodos, para así, poder esclarecer cual sería el método ideal para analizar TBARS en semen fresco, dado que, la mayor parte de estudios se enfoca en el análisis post descongelación.

Referencias bibliográficas

- Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008). REVIEW ARTICLE: Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0897.2007.00559.X>
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2018). Effect of ferrous ascorbate on in vitro capacitation of crossbred cattle bull spermatozoa. *Online Journal of Veterinary Research*, 22(1), 87–93.
- Bansal, Amrit Kaur, & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
- Barth, A. D., & Oko, R. J. (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa.*, Ed. 3, 1–50.
- Brouwers, J. F. H. M., & Gadella, B. M. (2003). In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(11), 1382–1391. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2003.08.010>
- Bucak, M. N., Sariözkan, S., Tuncer, P. B., Sakin, F., Ateşşahin, A., Kulaksiz, R., & Çevik, M. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2009.11.015>
- DE LAMIRANDE, E., & GAGNON, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 13(5), 379–386. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.1992.TB03328.X>

- Desai, N., Sharma, R., Makker, K., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2009). Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1626–1631. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2008.08.109>
- Dix, T. A., & Aikens, J. (1993). Mechanisms and Biological Relevance of Lipid Peroxidation Initiation. *Chemical Research in Toxicology*, 6(1), 2–18.
https://doi.org/10.1021/TX00031A001/ASSET/TX00031A001.FP.PNG_V03
- Dogan, S., Mason, M. C., Govindaraju, A., Belser, L., Kaya, A., Stokes, J., Rowe, D., & Memili, E. (2013). Interrelationships Between Apoptosis and Fertility in Bull Sperm. *Journal of Reproduction and Development*, 59(1), 18–26. <https://doi.org/10.1262/JRD.2012-068>
- Domínguez-Rebolledo, Á., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Del Olmo, E., Bisbal, A., Ros-Santaella, J. L., & Garde, J. J. (2010). Comparison of the TBARS Assay and BODIPY C11 Probes for Assessing Lipid Peroxidation in Red Deer Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6), e360–e368. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2009.01578.X>
- Dos Santos Hamilton, T. R., De Castro, L. S., De Carvalho Delgado, J., De Assis, P. M., Siqueira, A. F. P., Mendes, C. M., Goissis, M. D., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. Á., Nichi, M., Visintin, J. A., & D'Avila Assumpcao, M. E. O. (2016). Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. *Reproduction*, 151(4), 379–390. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0403>
- Franciscato, D. A. [UNESP]. (2015). Características físicas e morfológicas do sêmen de Bos taurus e Bos indicus antes e após a criopreservação. *Aleph*, xii, 39 p. : il.
<https://doi.org/10.17616/R31NJJN39>

- Freitas, P. B. (2008). Biotècnicas aplicadas a la reproduccion animal (segunda ed.). Brasil: ROCA LTDA.
- Gay, C., Collins, J., & Gebicki, J. M. (1999). Hydroperoxide Assay with the Ferric–Xylenol Orange Complex. *Analytical Biochemistry*, 273(2), 149–155.
<https://doi.org/10.1006/ABIO.1999.4208>
- Glozzi, T. M., Turri, F., Manes, S., Cassinelli, C., & Pizzi, F. (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 11(11), 1975–1982. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000684>
- Goovaerts, I. G. F., Hoflack, G. G., Van Soom, A., Dewulf, J., Nichi, M., de Kruif, A., & Bols, P. E. J. (2006). Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. *Theriogenology*, 66(2), 323–330.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.11.018>
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., Huberman, E., & Barr, S. H. (1999). Book Reviews Free Radicals in Biology and Medicine Carcinogenesis. *Journal of Free Radicals in Biology of Medicine*, 1(page 116), 331–334.
- Halliwell, B., Chirico, S., Crawford, M. A., Bjerve, K. S., & Gey, K. F. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S–725S. <https://doi.org/10.1093/AJCN/57.5.715S>
- Hopper, R. M. (2021). Bovine reproduction . John Wiley & Sons, Inc.
- Holt, W. V., & Van Look, K. J. W. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection

and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality.

Reproduction (Cambridge, England), 127(5), 527–535.

<https://doi.org/10.1530/REP.1.00134>

Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 9(6), 515–540. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2)

Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620–650. <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>

Kumar, A., Kroetsch, T., Blondin, P., & Anzar, M. (2015). Fertility-associated metabolites in bull seminal plasma and blood serum: ¹H nuclear magnetic resonance analysis. *Molecular Reproduction and Development*, 82(2), 123–131. <https://doi.org/10.1002/MRD.22450>

Lawson, J. A., Rokach, J., & FitzGerald, G. A. (1999). Isoprostanes: Formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 274(35), 24441–24444. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24441>

Lima, É. S., & Abdalla, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: Mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37(3), 293–303.

Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, Y., Uld, D. Q. G. L. Q., Ri, W. K. H. U., Lq, V., Frxqwu, W. K. H., Zklfk, E., Edvhg, L. V, ... فاطمی, ح. (2008). Sperm oxidative status and seminal quality in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus*

indicus bulls under tropical conditions. *Uniwersytet Śląski*, 43(1), 161 Res. P406.

<https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>

MacLeod, J. (1943). THE RÔLE OF OXYGEN IN THE METABOLISM AND MOTILITY OF HUMAN SPERMATOTZOA. *Https://Doi.Org/10.1152/Ajplegacy.1943.138.3.512*, 138(3), 512–518. <https://doi.org/10.1152/AJPLEGACY.1943.138.3.512>

MAIA, M., & em, S. B.-. (2009). Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Alice.Cnptia.Embrapa.Br*, 4, 183–193.

<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1010812>

Majić Balić, I., Milinković-Tur, S., Samardžija, M., & Vince, S. (2012). Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. *Theriogenology*, 78(2), 423–431.

<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.02.022>

Mashima, R., Onodera, K., & Yamamoto, Y. (2000). Regioisomeric distribution of cholesteryl linoleate hydroperoxides and hydroxides in plasma from healthy humans provides evidence for free radical- mediated lipid peroxidation in vivo. *Journal of Lipid Research*, 41(1), 109–115. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)32080-0](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)32080-0)

Nair, S. J., Brar, A. S., Ahuja, C. S., Sangha, S. P. S., & Chaudhary, K. C. (2006). A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Animal Reproduction Science*, 96(1–2), 21–29. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.11.002>

Nichi, M., Bols, P. E. J., Züge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G. F., Barnabe, R. C., & Cortada, C. N. M. (2006). Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus*

bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, 66(4), 822–828.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.056>

Nichi, Marcilio. (2004). *Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS*. <https://doi.org/10.11606/D.10.2003.TDE-14062004-114313>

O’Flaherty, C. (2014). The Enzymatic Antioxidant System of Human Spermatozoa. *Advances in Andrology*, 2014, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2014/626374>

Porter, N. A., Caldwell, S. E., & Mills, K. A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30(4), 277–290. <https://doi.org/10.1007/BF02536034>

Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-12/TABLES/2>

Sawyer, D. E., Roman, S. D., & Aitken, R. J. (2001). Relative susceptibilities of mitochondrial and nuclear DNA to damage induced by hydrogen peroxide in two mouse germ cell lines. *Redox Report*, 6, 182–184. <https://doi.org/10.1179/135100001101536157>

Schöneck, C., Braun, J., & Einspanier, R. (1996). Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, 45(3), 633–642. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00409-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00409-2)

Sharma, R. K., & Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48(6), 835–850. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(96\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(96)00313-5)

Sikka, S. C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm

function. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 1, e78-86.

<https://doi.org/10.2741/A146/PDF>

Stewart, I. I. (1999). Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation.

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 54(12), 1649–1695.

[https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(99\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(99)00110-X)

Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Human*

Reproduction Update, 14(3), 243–258. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMN004>

Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Stewart Irvine, D., & John Aitken, R. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reproduction*, 13(6), 1429–1436.

<https://doi.org/10.1093/HUMREP/13.6.1429>

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149–179.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1)

Vince, S., Žura Žaja, I., Samardžija, M., Majić Balić, I., Vilić, M., Duričić, D., Valpotić, H., Marković, F., & Milinković-Tur, S. (2018). Age-related differences of semen quality, seminal plasma, and spermatozoa antioxidative and oxidative stress variables in bulls during cold and warm periods of the year. *Animal*, 12(3), 559–568.

<https://doi.org/10.1017/S1751731117001811>

Visintin, J. A., Martins, J. F. P., Bevilacqua, E. M., Mello, M. R. B., Nicácio, A. C., &

Assumpção, M. E. O. A. (2002). Cryopreservation of bos taurus vs bos indicus embryos: are

they really different? *Theriogenology*, 57(1), 345–359. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00675-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00675-6)

- Žaja, I. Ž., Samardžija, M., Vince, S., Majić-Balić, I., Đuričić, D., & Milinković-Tur, S. (2016). Influence of different periods of the year and age on the parameters of antioxidative status and oxidative stress in the blood serum of breeding bulls. *Reproductive Biology*, 16(2), 157–164. <https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2016.03.003>
- Žura Žaja, I., Samardžija, M., Vince, S., Majić-Balić, I., Đuričić, D., & Milinković-Tur, S. (2016). Antioxidant system parameters in boar spermatozoa of different morphology and motility. *Veterinarski Arhiv*, 86(5), 655–666.

Anexos

Figura 7

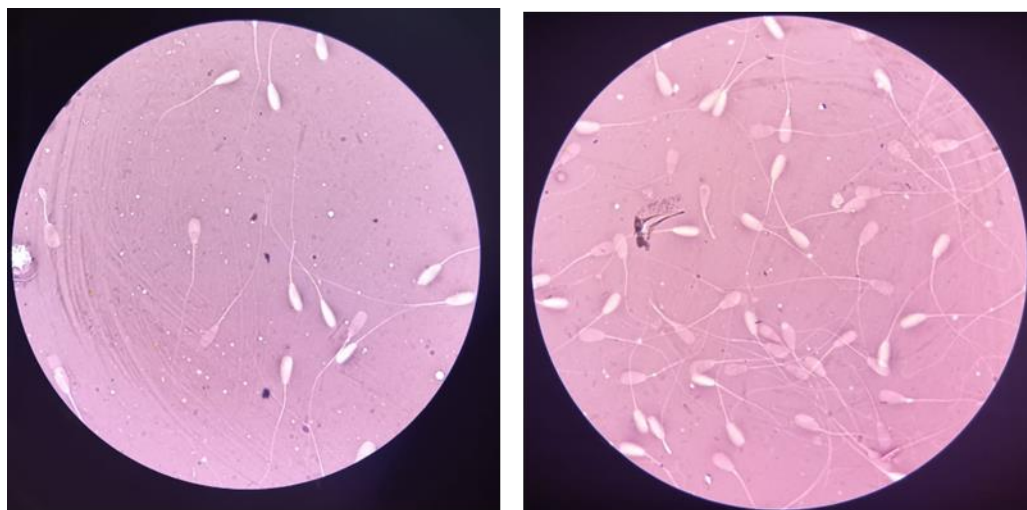
Central de colecta Bela Vista



Nota. Lugar en donde se colectaron las muestras de semen bovino.
Fuente: Forero (2023).

Figura 8

Análisis integridad de membrana espermática



Nota. Tinción Eosina-Nigrosina en microscopio convencional con lente de 100x. *Fuente:* Forero (2023).