



ORINOQUIA

ISSN: 0121-3709

Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana

Velásquez-Penagos, José G.; Velásquez-Penagos, José H.; Gutiérrez-Parrado, Sonia Lucía; Barajas-Pardo, Diana Patricia; Neira-Rivera, Eliana; Ortiz-Valdés, Ciro; Onofre-Rodríguez, Héctor G.

Consumo de agua tratada de producción petrolera en la fertilidad del bovino macho del sistema doble propósito

ORINOQUIA, vol. 23, núm. 2, 2019, Julio-Diciembre, pp. 25-35

Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana

DOI: 10.22579/20112629.566

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89662922003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en [redalyc.org](http://redalyc.org)

redalyc.org  
UAEM

Sistema de Información Científica Redalyc  
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Orinoquia, Julio-Diciembre 2019;23(2):25-35  
ISSN electrónico 2011-2629.  
ISSN impreso 0121-3709.  
<https://doi.org/10.22579/20112629.566>

## Consumo de agua tratada de producción petrolera en la fertilidad del bovino macho del sistema doble propósito

### Consumption of treated water from oil production in male bovine fertility of the double purpose system

### Consumo de água tratada na produção de óleo no sistema de dupla finalidade de fertilidade bovina masculina

*José G. Velásquez-Penagos<sup>1\*</sup>; José H. Velásquez-Penagos<sup>2\*</sup>; Sonia Lucía Gutiérrez-Parrado<sup>3\*</sup>;  
Diana Patricia Barajas-Pardo<sup>4</sup>; Eliana Neira-Rivera<sup>5\*</sup>; Ciro Ortiz-Valdés<sup>6\*</sup>;  
Héctor G. Onofre-Rodríguez<sup>7\*</sup>*

<sup>1</sup> MV, MSc, PhD

<sup>2</sup> MVZ, MSc

<sup>3</sup> MVZ, Esp. Gerencia de proyectos

<sup>4</sup> MV, PhD, Universidad Cooperativa de Colombia, Grupo de investigación de Reproducción Animal Tropical.

<sup>5</sup> MVZ, MSc

<sup>6</sup> MVZ

<sup>7</sup> MVZ

\* Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria- AGROSAVIA, Grupo de investigación de Reproducción Animal Tropical.

Email: [jvelasquez@agrosavia.co](mailto:jvelasquez@agrosavia.co)

Dirección postal: 500009

**Recibido:** 03 de julio de 2019

**Aceptado:** 26 de agosto de 2019

#### Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el consumo de agua tratada proveniente de la producción petrolera en la calidad seminal del macho bovino reproductor, para ello se seleccionaron 16 toros entre 4 y 5 años distribuidos en dos grupos en los centros de investigaciones La Libertad de Agrosavia en Villavicencio y el Área de sostenibilidad agroenergetica, ASA en Acacias con disponibilidad de agua tratada de los campos petroleros, Apiay (A) y Castilla (C) respectivamente. Los animales seleccionados fueron distribuidos al azar para cada localidad en 4 tratamientos: 1) Consumo del 100% agua de producción tratada; 2) consumo de mezcla 50% agua de producción tratada y 50% agua cruda; 3) consumo de mezcla 25% agua de producción tratada y 75% agua cruda; y 4) consumo 100% agua cruda. Las variables consideradas fueron: calidad seminal para A y C determinadas por un sistema computarizado y de fertilidad *in vitro* para A evaluada por tinción

#### Como Citar (Norma Vancouver):

Velásquez-Penagos JG, Velásquez-Penagos JH, Gutiérrez-Parrado SL, Barajas-Pardo DP, Neira-Rivera Eliana,et al. Consumo de agua tratada de producción petrolera en la fertilidad del bovino macho del sistema doble propósito. Orinoquia, 2019; 23(2):25-35. DOI:<https://doi.org/10.22579/20112629.566>

fluorescente, Hoechst 33342. Los datos se analizaron estadística descriptiva, análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias, Tukey, en un modelo de medidas repetidas en el tiempo. Los resultados indicaron, para calidad seminal, que los tratamientos que consumieron A y C en cada localidad presentaron diferencias ( $P < 0,05$ ) para motilidad,  $75,00 \pm 4,50$ ,  $69,24 \pm 4,13$ , espermatozoides motiles/100 células evaluadas, en el tratamiento dos respectivamente y en A para morfología,  $76,67 \pm 2,06$  espermatozoides normales/100 en el tratamiento cuatro, el índice de calidad espermática (ICE) no mostró diferencia ( $P > 0,05$ ). Los resultados de unión espermatozoide - zona pelúcida mostraron diferencias entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), al igual que en fecundación *in vitro*, sin embargo, el comportamiento de estos cambios no indica asociación con el consumo de este tipo de agua. El estudio muestra que no se observan cambios contundentes o negativos que demuestren efecto en la fertilidad del toro por consumo de agua de producción tratada.

**Palabras claves:** calidad espermática; *in vitro*; ovocitos; reproducción; semen

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the consumption of treated water from oil production in the seminal quality of the breeding male; To this end, 16 bulls between 4 and 5 years old were selected, distributed in two groups at Agrosavia's La Libertad centers in Villavicencio and the Agroenergetic Sustainability Area, ASA in Acacias with availability of treated water from the oil fields, Apiay (A) and Castilla (C) respectively. The selected animals were distributed randomly to each location in 4 treatments: 1) Consumption of 100% treated production water; 2) 50% consumption of treated production water and 50% raw water consumption; 3) mixing consumption 25% treated production water and 75% raw water; and 4) 100% raw water consumption. The variables considered were: seminal quality for A and C determined by a computerized system, and *in vitro* fertility for A evaluated by fluorescent staining, Hoechst 33342. The data were analyzed descriptive statistics, analysis of variance (ANOVA) and means comparison tests, Tukey, in a model of measures repeated over time. The results indicated, for seminal quality, that the treatments that consumed A and C in each locality presented differences ( $P < 0,05$ ) for motility,  $75,00 \pm 4,50$ ,  $69,24 \pm 4,13$ , motile sperm / 100 cells evaluated, in treatment two respectively and in A for morphology,  $76,67 \pm 2,06$  normal sperm / 100 in treatment four, the sperm quality index (SQI) showed no difference ( $P > 0,05$ ). The results of sperm-pellucid zone binding showed differences between treatments ( $P < 0,05$ ), as in *in vitro* fertilization, however, the behavior of these changes does not indicate an association with the consumption of this type of water. The study shows that there are no strong or negative changes that show an effect on the fertility of the bull due to the consumption of treated production water.

**Key words:** sperm quality; *in vitro*; oocytes; reproduction; semen

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o consumo de água tratada da produção de óleo na qualidade seminal do macho reprodutor; Para tanto, foram selecionados 16 touros entre 4 e 5 anos, distribuídos em dois grupos nos centros de La Libertad de Agrosavia em Villavicencio e na Área de Sustentabilidade Agroenergética, ASA em Acacias com disponibilidade de água tratada dos campos de petróleo, Apiay (A) e Castilla (C) respectivamente. Os animais selecionados foram distribuídos aleatoriamente para cada local em 4 tratamentos: 1) Consumo de água de produção tratada 100%; 2) 50% de consumo de água de produção tratada e 50% de consumo de água bruta; 3) consumo de mistura 25% de água de produção tratada e 75% de água bruta; e 4) 100% de consumo de água bruta. As variáveis consideradas foram: qualidade seminal para A e C, determinada por sistema computadorizado, e fertilidade *in vitro* para A, avaliada por coloração fluorescente, Hoechst 33342. Os resultados indicaram, para qualidade seminal, que os tratamentos que consumiram A e C em cada localidade apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) para motilidade,  $75,00 \pm 4,50$ ,  $69,24 \pm 4,13$ , espermatozoides móveis / 100 células avaliadas, no tratamento dois respectivamente e em A para morfologia,  $76,67 \pm 2,06$  espermatozoides normais / 100 no tratamento quatro, o índice de qualidade espermática (IQE) não apresentou diferença ( $P > 0,05$ ). Os resultados de ligação das zonas pelúcidas de espermatozoides mostraram diferenças entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ), como na fertilização *in vitro*, entretanto, o comportamento dessas mudanças não indica uma associação com o consumo desse tipo de água. O estudo mostra que não há mudanças fortes ou negativas que mostram um efeito sobre a fertilidade do touro devido ao consumo de água de produção tratada.

**Palavras-chave:** qualidade espermática; *in vitro*; oócitos; reprodução; sêmen

## Introducción

El petróleo que se extrae de la tierra, se encuentra mezclado con aguas, que se conocen como “aguas de producción”, las cuales hacen parte de los fluidos naturales de los yacimientos. En Colombia, por cada barril de petróleo se producen, en promedio, 17,8 barriles de agua. Las aguas de producción pueden

ser tratadas y reinyectadas en la misma formación para mantener la presión de los yacimientos y aumentar el “factor de recobro”. También pueden ser tratadas y vertidas a cuerpos de agua superficiales o al suelo; o ser reinyectadas en los yacimientos como alternativa de disposición final (Almansa et al., 2018).

Los estudios relacionados con los efectos sobre la producción por el uso de agua tratada proveniente de la extracción de petróleo realizados por Almansa *et al.*, (2018), demostraron que no se observaron diferencias en los parámetros productivos de los animales experimentales que consumieron y no consumieron agua de producción. Estudios similares en bovinos no se reportan en la literatura revisada.

En el campo de la reproducción, la fertilidad es la capacidad de un animal de producir o sustentar una progenie, para que esta premisa se considere cierta, la función reproductiva, tanto del macho como de la hembra debe ser eficiente. La importancia de las pruebas de fertilidad en la ganadería se refleja en la identificación de sementales infértil o sub-fértil (Orantes *et al.*, 2010).

El análisis seminal además de confirmar la capacidad reproductiva, se puede utilizar para determinar el número de dosis seminales viables para criopreservar y para diagnosticar causas específicas de infertilidad (Chenoweth *et al.*, 2016; Brito, 2016). Según lo encontrado por Flowers (2013), los toros tienen un mayor efecto sobre la fertilidad del hato que las hembras y es más grave por el uso generalizado para monta natural sin previa evaluación de fertilidad (Thundathil *et al.*, 2016) (Parkinson, 2004). Económicamente la capacidad reproductiva del macho es medida por el número de crías producidas y la mejora genética que aporta al rebaño (Petherick JC, 2004).

La calidad del eyaculado es valorada por parámetros macroscópicos, tales como volumen, color, densidad y microscópicos de motilidad, concentración, viabilidad y morfología (Quintero *et al.*, 2017). La evaluación de motilidad proporciona información importante sobre el estado energético de los espermatozoides y desempeña una función vital cuando el esperma alcanza la unión utero-tubal que contiene moco y puede actuar como barrera para los espermatozoides con poca motilidad. No obstante, se considera la evaluación de la motilidad un método de análisis subjetivo con hasta el 30 a 60% de variaciones de interpretación (Contri *et al.*, 2010). Sin embargo, la implementación del sistema computarizado de análisis de semen CASA (computer-assisted sperm analysis) constituye un método objetivo de evaluación que permite el conteo de las células móviles y descripción a través del seguimiento de su desplazamiento, de las características del movimiento flagelar de los espermatozoides, asociándola al estado funcional de los mismos (Kastelic y Thundathil, 2008).

A pesar de que la evaluación de parámetros simples de la calidad del semen (motilidad, concentración,

viabilidad y morfología) ha sido valiosa en la identificación de toros de baja fertilidad, sólo constituye un predictivo de bajo valor de fertilidad absoluta (Parkinson, 2004). Por lo tanto, en un esfuerzo por encontrar otras características del semen que estén más estrechamente relacionadas con la fertilidad, se han desarrollado pruebas de laboratorio a nivel celular y molecular (Kastelic y Thundathil, 2008) que permiten evaluar diferentes aspectos de la integridad y la funcionalidad espermática. (Yániz *et al.*, 2018), estas pruebas incluyen los test de resistencia a condiciones hiposmóticas ó test HOST (Prinosilova *et al.*, 2014), estudios de metabolómica que permiten la identificación y cuantificación de moléculas pequeñas como aminoácidos y péptidos (Velho *et al.*, 2018), los marcadores de fertilidad en los estudios de proteómica del plasma seminal (Viana *et al.*, 2018) y las sondas fluorescentes que permiten evaluar la integridad de la membrana con fluorocromos como el ioduro de propidio (Yániz *et al.*, 2013), las lectinas y las clortetraciclina, los colorantes específicos para las mitocondrias y la naranja de acridina para evaluar la integridad de la cromatina (Rossetto A, 2005).

Así, la fertilidad del macho se puede estimar por la capacidad de los espermatozoides para penetrar ovocitos *in vitro* (Ferraz *et al.*, 2014), la cual evalúa además de la motilidad de los espermatozoides y penetración, la capacitación espermática y la reacción acrosómica (Restrepo *et al.*, 2013); otro método de evaluación de la fertilidad es mediante el test de unión de espermatozoide-zona pelúcida (Velásquez *et al.*, 2007), y mediante la fertilización *in vitro* (FIV), que es una técnica más sensible para la evaluación de la fecundación (Fair y Lonergan 2018).

El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de agua de producción tratada asociada a la extracción de hidrocarburos, sobre la fertilidad en bovinos machos del sistema de doble propósito.

## Materiales y métodos

### Localización

El desarrollo del estudio se llevó a cabo en el centro de investigación La Libertad de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Agrosavia (Villavicencio - Meta, Colombia), y en la estación experimental ASA (Área de Sostenibilidad Agroenergética, (Acacias - Meta, Colombia) respectivamente; localizadas en la subregión del piedemonte Llanero Colombiano, a una altura de 336 m.s.n.m, y 352 m.s.n.m, temperatura promedio de 26°C y 26°C, precipitación

promedia anual de 2950 mm<sup>3</sup> y 2700 mm<sup>3</sup>, humedad relativa del 78% y 80% respectivamente. El agua tratada de la producción de petróleo se obtuvo de los campos petroleros de Apiay

### **Animales**

Se seleccionaron 16 bovinos machos, valorados clínicamente y determinados en buen estado sanitario y nutricional, distribuidos en dos grupos en las localidades del centro de investigación La Libertad y el ASA, alimentados en praderas de *Brachiaria decumbens*, sal del 8% de fósforo a voluntad, que consumieron agua de producción tratada del campo petrolero de Apiay (A) y Castilla (C) respectivamente. Los animales seleccionados en cada grupo fueron distribuidos al azar en 4 tratamientos: 1) Consumo del 100% de agua de producción tratada 2) consumo de la mezcla de 50% de agua de producción tratada y 50% de agua cruda; 3) consumo de la mezcla de 25% de agua de producción tratada y 75% de agua cruda; y 4) consumo de 100% de agua cruda (tratamiento control). Los ensayos se realizaron entre el 2009 y el 2015 bajo el marco regulatorio del decreto 1594 de 1984 de Colombia.

### **Reactivos y materiales de laboratorio**

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma - Aldrich Co. (San Luis Missouri E.E.U.U), los platos de cultivo celular fueron de marca TPP (Techno Plastic Products, Suiza) y los platos de 4 pocillos fueron de marca Nunc® (Fisher Scientific, Reino Unido). Los tubos cónicos para colección de semen se obtuvieron de Fisher Scientific (Reino Unido).

### **Evaluación de semen in natura:**

El semen se recolectó mediante la técnica de electro-eyaculación empleando el equipo Electro-Jac 5, el cual genera pulsaciones eléctricas por medio de un electrodo que estimula los nervios pélvicos, induciendo así la erección peneana y la eyaculación. Una vez obtenida la muestra se realizó evaluación macroscópica que incluyó: volumen, el cual se determinó depositando el eyaculado en un tubo cónico aforado; el color, normalmente blanco lechoso y el aspecto (acuoso, lechoso, cremoso). La evaluación microscópica se realizó empleando el equipo CASA (IVOS II. Hamilton Thorne Inc. Beverly Massachusetts, E.E.U.U), que permite el análisis de la concentración, del número de espermatozoides motiles y los parámetros espermáticos de movimiento. Para la determinación de la viabilidad espermática se evaluó la integridad de la membrana espermática empleando la tinción vital eosina-nigrosina, esta técnica

se basa en la exclusión de la eosina por parte de los espermatozoides intactos, mientras que los muertos, con la membrana plasmática dañada absorben el color rojo del colorante (eosina), la evaluación consistió en contar los espermatozoides sin teñir (blancos) los cuales se consideraron "vivos" y los teñidos (rosas) total o parcialmente considerados "muertos", con apoyo de un microscopio (Nikon Eclipse E-200 Nikon Instruments Inc. Melville, Nueva York, E.E.U.U) con aumentos de 200X a 400X contando en un total de 100 las células vivas por muestra, en tres campos. Para la evaluación de la morfología se utilizaron los mismos frotis y metodología empleadas en la viabilidad pero en este caso diferenciando los espermatozoides normales. De las determinaciones consideradas en la evaluación microscópica se derivó la variable índice de calidad espermática (ICE), que integra la motilidad, la viabilidad y la morfología y visualiza en forma general la calidad espermática

### **Congelación de semen**

Una vez realizada la valoración microscópica del semen, se calculó el número de dosis para cada eyaculado teniendo en cuenta una concentración de 60'000.000 de espermatozoides motiles por mililitro. Para ello se empleó la siguiente fórmula matemática:

$$\text{Volumeneyaculado * concentraciónml *} \\ \text{Volumen final} = \frac{\text{motilidad% * normalidad% * viabilidad%}}{60 * 10^6}$$

La dilución del semen se realizó empleando el diluyente comercial Bioxcell a dos pasos (IMV Technologies). La fracción A del diluyente rica en nutrientes se ajustó a la misma temperatura del eyaculado y se añadió en la cantidad equivalente al semen, el resto de la fracción A del diluyente se añadió a los 10-15 minutos siguientes a la primera dilución, el semen diluido fue homogenizado suavemente. La adición de la fracción B del diluyente (Glicerol) se realizó cuando la dilución con la fracción A se estabilizó a una temperatura de 5°C, la fracción B se dividió en cuatro porciones y se adicionó a la dilución A a intervalos de 15 minutos a 5°C. Luego de la adición de las fracciones A y B del diluyente se dejó en fase de equilibrio el semen diluido a una temperatura de 5°C durante 16 horas. Transcurrido este lapso se procedió a empacar el semen en las pajillas marcadas con la identificación del toro y el tratamiento. El empaque y el sellado de las pajillas se realizó con el equipo de empaque y sellado (IMV Technologies, Francia). Una vez empacado el semen en las pajillas, se procedió a realizar la curva de congelación, para ello se ubicaron las pajillas en rampas metálicas dentro de la olla de congelación a una altura

de 5 centímetros sobre el nivel de nitrógeno líquido donde recibieron los vapores del nitrógeno líquido durante 10 minutos, una vez transcurridos se sumergen las pajillas directamente en el nitrógeno líquido.

### **Evaluación del semen criopreservado**

Para la evaluación del semen criopreservado de los toros, se realizó la descongelación de las pajillas a 37 °C durante 1 minuto, en un baño de agua termostatado; los parámetros que se evaluaron fueron motilidad y concentración, empleando el equipo CASA. También se evaluó la viabilidad y morfología espermática mediante tinción vital (eosina - nigosina) observada en microscopio, con 200X a 400X contando un total de 100 células por muestra, en tres campos.

### **Fecundación In vitro**

Para la prueba de fecundación *In vitro*, los ovocitos seleccionados se obtuvieron a partir de ovarios del frigorífico local (Friogan, Villavicencio), que fueron colectados inmediatamente después del sacrificio de hembras bovinas del sistema doble propósito, y transportados al laboratorio de reproducción del CI La Libertad, en solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) a ±35 °C, suplementado con 100 UI/ml Penicilina - Estreptomicina (Sigma), en un tiempo menor a 90 minutos luego del sacrificio. Una vez en el laboratorio se retiró el mesovario y tejido adyacente empleando tijera quirúrgica punta - roma, y se lavaron 3 veces con la misma solución y a la misma temperatura anteriormente descrita. De los folículos ováricos se recuperaron los complejos címulos - ovocitos, mediante aspiración con jeringa de 10 ml y aguja calibre 18 Gauss; el contenido se depositó en un tubo cónico de 15 ml (Fisher Scientific E.E.U.U). Una vez aspirados todos los ovarios se dejó sedimentar el contenido del tubo por 15 minutos, quedando el sobrenadante (líquido folicular) y el sedimento (ovocitos). El sobrenadante se centrifugó a ± 35 °C en una centrifuga (THERMO Electron Corporation. IEC CENTRA CL3R9) a 700 gravedades por 5 minutos. El líquido folicular centrifugado se empleó como medio de búsqueda de los CCOs.

En la búsqueda de los ovocitos, fueron seleccionados los CCOs con mayor tamaño y con al menos 3 capas de células del címulo, con címulos compactos y citoplasma homogéneo. El medio de maduración de los ovocitos empleado fue el TCM-199 (Sigma) suplementado con suero fetal bovino (Gibco) al 10%, amicacina (Sigma), LH (Sigma), FSH (Sigma) y L-Glutamina (Sigma). Los CCOs se cultivaron con el medio descrito en cajas de cuatro pocillos Nunc® de 500 µl que fue-

ron cubiertos con aceite mineral estéril (Sigma), y se llevaron a la incubadora a 38 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa, por un lapso de 24 horas, para su posterior fecundación.

Para la preparación del esperma, selección y capacitación espermática, se descongelaron las pajillas de semen por inmersión en agua a 37 °C por 1 minuto, se transfirió el contenido de la pajilla a un tubo vial de 1.5 ml que contenía los gradientes de Percoll (Sigma) (400 µl de Percoll 90% y 400 µl de Percoll 45%), el cual fue centrifugado a 900 gravedades por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, dejando únicamente el sedimento (espermatozoides motiles). El sedimento recuperado fue resuspendido en 1 ml de medio Sperm Talp de capacitación espermática en un tubo vial, y posteriormente se centrifugó a 900 gravedades por 5 minutos, el precipitado fue resuspendido en medio FIV, de este se tomó una muestra para el conteo de concentración espermática para determinar la dosis inseminante a una concentración final de 1x10<sup>6</sup>.

Los ovocitos se cambiaron de medio de maduración donde estuvieron por 24 horas a medio de fertilización FIV-Talp suplementando con PHE (Penicilamina, hipotaurina, epinefrina) (Sigma) y heparina (Sigma), fueron lavados 3 veces en gotas del medio de fertilización. Los espermatozoides seleccionados y capacitados se co-cultivaron con los ovocitos a una concentración de 1\*10<sup>6</sup> espermatozoides por mililitro en cajas de cuatro pocillos Nunc® de 500 µl cubiertas con aceite mineral estéril (Sigma), y se llevaron a la incubadora a 38 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa por 18 horas.

### **Fijación, tinción y evaluación de la fertilización de los ovocitos**

A las 18 horas post-fertilización de los ovocitos se pasaron a un plato de Petri con DPBS e hialuronidasa durante 5 minutos, y se lavaron mediante pipeteo, con el fin de remover los espermatozoides adheridos y restos de las células del címulo. Posteriormente los ovocitos fueron fijados con glutaraldehído al 0.5% durante 30 minutos, se les realizó un lavado en DPBS y se tiñeron con Hoechst 33342 (B-2261 Sigma) durante 15 minutos. Los ovocitos fueron evaluados en el microscopio (Leica DM 2000) con filtro de fluorescencia con rango de excitación para luz ultravioleta y observados a 200 aumentos. Para la evaluación de la fertilización de la presencia de los dos pronucleos, masculino y femenino como fertilizado y las demás formas de presentación como no fertilizado (Coy et al., 2005).

## Interacción espermatozoide - Zona pelúcida (ZP),

### Test de unión:

Para el test de unión espermatozoide zona pelúcida, las muestras de semen obtenidas son criopreservadas y evaluadas por la capacidad de unión. Para ello se utilizaron concentraciones de 30'000.000 de EPZ/ml que se cocultivaron con zonas pelúcidas por 30 minutos; pasado este tiempo se realizaron dos lavados y posteriormente se determinaron cuantos espermatozoides estaban unidos a las zonas pelúcidas. Las ZP se obtuvieron de ovocitos aspirados de ovarios de frigorífico, mediante el pipeteo.

### Ánalisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante estadística descriptiva, análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias, Tukey, en un modelo de medidas repetidas en el tiempo.

## Resultados

### Evaluación de la calidad espermática

Los resultados de los reportes individuales de cada evaluación de calidad espermática, previo a su análisis, no mostraron cambios que indicaran alteraciones que pudieran afectar la eficiencia reproductiva.

**Tabla 1.** Valores promedio de evaluación de la calidad espermática, Volumen, Concentración, Motilidad, Viabilidad, morfología e índice de calidad espermática de toros que consumieron diferentes mezclas de agua de producción tratada del campo petrolero Apiay en el CI La Libertad de Agrosavia.

Indicador	Nº de pruebas por tratamiento	Tratamiento 1 (100 %)	Tratamiento 2 (50 %)	Tratamiento 3 (25 %)	Tratamiento (Control) 4 (0 %)
Volumen cc	7	8,17+1,26 <sup>a</sup>	12+2,00 <sup>a</sup>	9,17+1,44 <sup>a</sup>	9,00 + 2,2 <sup>a</sup>
Concentraciónx10 <sup>6</sup>	7	960,67+238,5 <sup>a</sup>	993,33+5,32 <sup>a</sup>	890+130,77 <sup>a</sup>	1019+156,31 <sup>a</sup>
Motilidad, (Nº EPZ* motiles/100 células evaluadas)*	7	83,33+2,89 <sup>a</sup>	75,00+4,50 <sup>b</sup>	83,32+5,77 <sup>a</sup>	82,33+2,52 <sup>ab</sup>
Viabilidad (Nº EPZ vivos/100 células evaluados)	7	78,67+3,79 <sup>a</sup>	78,33+2,89 <sup>a</sup>	79,33+4,16 <sup>a</sup>	79,67 + 2,09 <sup>a</sup>
Morfología (Nº EPZ* normales/100 células evaluados) *	7	82,67+3,39 <sup>a</sup>	83,67+4,73 <sup>a</sup>	80,33+4,5 <sup>ab</sup>	76,67+2,06 <sup>b</sup>
ICE	7	0,52+0,08 <sup>a</sup>	0,49+0,05 <sup>a</sup>	0,47+0,08 <sup>a</sup>	0,51+0,07 <sup>a</sup>

ICE= Índice de calidad espermática derivado de la motilidad, viabilidad y morfología; Medias con por lo menos una letra en común en sentido horizontal no presentan diferencias estadísticas según prueba de tukey, ( $\alpha = .05$ ). EPZ: Espermatozoides. ICE= Índice de calidad espermática derivado de la motilidad, viabilidad y morfología. Fuente: Elaboración propia.

En este sentido, en la Tabla 1 se observan los cambios del comportamiento de los parámetros de calidad del semen, en los cuatro tratamientos de agua de extracción tratada del campo petrolero Apiay (A) considerados en la localidad del CI la Libertad.

Los valores promedio de los diferentes tratamientos variaron entre  $8,17\pm1,26$  y  $12\pm2,00$  ml para volumen seminal sin presentar cambios significativos ( $p>0,05$ ) al igual que los promedios que variaron entre  $890\pm130,77$  y  $1019\pm156,31$  EPZ X  $10^6$  /ml para concentración,  $78,33\pm2,89$  y  $79,67\pm2,09$  EPZ/100 células para viabilidad y,  $0,47\pm0,08$  y  $0,52\pm0,08$  para índice de calidad espermática, respuesta que difirió para los promedios  $75,00\pm4,50$  del tratamiento 2 (consumo de agua de producción tratada en mezcla del 50%) y  $83,32\pm5,77$  del tratamiento 3 (consumo de agua de producción tratada en mezcla del 25%) y siendo diferentes para motilidad que indicaron diferencia significativa ( $p<0,05$ ), en esta variable, el tratamiento control no indicó diferencias significativas entre tratamientos ( $p>0,05$ ) y para morfología en donde el tratamiento control fue diferente para los tratamientos 100% y 50% ( $p<0,05$ ).

Los resultados obtenidos para el ASA (tabla 2) de los toros sometidos a cada tratamiento, en las variables de calidad espermática: volumen seminal, concentración, viabilidad, morfología e ICE, muestran promedios que variaron entre  $5,19\pm2,74$  y  $7\pm1,92$  ml;  $795\pm280,74$  y  $1019\pm156,31$  EPZ X  $10^6$  /ml;  $71,31\pm3,45$  y

**Tabla 2.** Valores promedio de evaluación de la calidad espermática, Volumen, Concentración, Motilidad, Viabilidad, morfología e Índice de calidad espermática de toros que consumen diferentes mezclas de agua de producción tratada del campo petrolero de Castilla en la unidad experimental del ASA.

Indicador	Nº de pruebas por tratamiento	Tratamiento 1 (100 %)	Tratamiento 2 (50 %)	Tratamiento 3 (25 %)	Tratamiento (Control) 4 (0 %)
Volumen cc	3	6,27 $\pm$ 1,26 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 1,92a	5,19 $\pm$ 2,74 <sup>a</sup>	6,35 $\pm$ 2,42 <sup>a</sup>
Concentración $\times 10^6$	3	865,61 $\pm$ 241,3 <sup>a</sup>	918,32 $\pm$ 5,32 <sup>a</sup>	795 $\pm$ 280,74 <sup>a</sup>	1019 $\pm$ 156,31 <sup>a</sup>
Motilidad, (Nº de EPZ* motiles /100 células evaluadas)	3	78,27 $\pm$ 7,69 <sup>a</sup>	69,24 $\pm$ 4,13 <sup>b</sup>	83,33 $\pm$ 6,71 <sup>a</sup>	81,34 $\pm$ 3,54 <sup>a</sup>
Viabilidad (Nº de EPZ vivos/100 células evaluados)	3	72,42 $\pm$ 4,68 <sup>a</sup>	74,28 $\pm$ 2,16 <sup>a</sup>	71,31 $\pm$ 3,45 <sup>a</sup>	73,62 $\pm$ 2,14 <sup>a</sup>
Morfología (Nº EPZ normales/100 células evaluados)	3	81,62 $\pm$ 4,27 <sup>a</sup>	78,53 $\pm$ 3,62 <sup>a</sup>	80,32 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	82,43 $\pm$ 3,22 <sup>a</sup>
ICE	3	0,40 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,43 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>

ICE= Índice de calidad espermática derivado de la motilidad, viabilidad y morfología; Medias con por lo menos una letra en común en sentido horizontal no presentan diferencias estadísticas según prueba de tukey, ( $\alpha = .05$ ). EPZ: Espermatozoides **Fuente:** Elaboración propia.

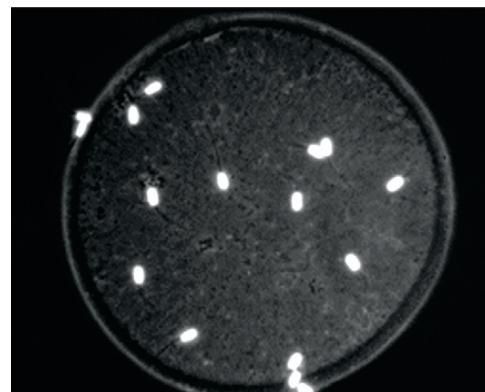
74,28 $\pm$ 2,16 EPZ/100 células evaluadas y, 78,53 $\pm$ 3,62 - 82,43 $\pm$ 3,22 respectivamente sin indicar para cada una de las variables cambios significativos entre tratamiento ( $p>0,05$ ). La variable motilidad espermática 78,27 $\pm$ 7,69 EPZ/100 células evaluadas en el tratamiento 2 consumo de agua de producción tratada en mezcla del 50% indica cambios significativos con los demás tratamientos ( $p<0,05$ ).

#### **Pruebas In vitro de calidad espermática, test de unión**

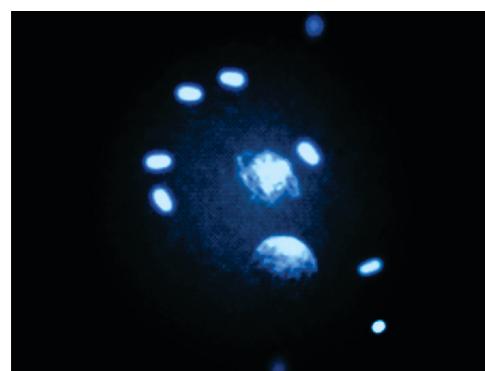
En la Tabla 3 y en la Figura 1 se pueden observar los valores promedios de la prueba *in vitro* de fertilidad de los toros que fueron sometidos a diferentes mezclas de agua de producción tratada. Los resultados indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P<0,05$ ), y más específicamente sobre el tratamiento 2 (consumo de agua de producción tratada en dilución del 50%) en el que se observa el valor de menos espermatozoides unidos a la zona pelúcida. Estos resultados indican cambios significativos para esta variable; sin embargo, el comportamiento de los valores obtenidos en los tratamientos 4 (control) y 1 (100%), no fueron estadísticamente diferentes ( $P>0,05$ ).

#### **Fertilización in vitro:**

En la Tabla 4 y en la Figura 2 se observan los resultados de fertilización *in vitro* determinado como positivo por la



**Figura 1.** Espermatozoides unidos a la zona pelúcida. **Fuente:** Imagen propia.



**Figura 2.** Ovocito fertilizado con presencia de dos pronúcleos. **Fuente:** Foto propia.

**Tabla 3.** Valores promedio de evaluación de la calidad espermática *in vitro* mediante el test de unión espermatozoide zona pelúcida de toros que consumen diferentes mezclas de agua de producción tratada del campo petrolero de Apiay

Test de Unión	Tratamiento 1 (100 %)	Tratamiento 2 (50 %)	Tratamiento 3 (25 %)	Tratamiento (Control) 4 (0 %)
Número de pruebas	6	6	6	6
Número total de zonas pelúcidas	120	106	125	122
Espermatozoides unidos a la zona pelúcida*	34±2,41 <sup>a</sup>	23,20±1,9 <sup>b</sup>	30,40±3,36 <sup>ab</sup>	33±1,58 <sup>a</sup>

Medias con por lo menos una letra en común en sentido horizontal no presentan diferencias estadísticas según prueba de tukey, ( $\alpha = .05$ ). **Fuente:** Elaboración propia.

**Tabla 4.** Valores promedio de evaluación de la calidad espermática *in vitro* mediante pruebas de fecundación y desarrollo embrionario en ovocitos de matadero de toros que consumen diferentes mezclas de agua de producción tratada del campo petrolero de Apiay.

Indicador	Nº de pruebas	Tratamiento 1 (100 %)	Tratamiento 2 (50 %)	Tratamiento 3 (25 %)	Tratamiento (Control) 4 (0 %)
Fecundación <i>in vitro</i> (Nº ovocitos fecundados /100 ovocitos evaluados)	5	66,9±7,2 <sup>a</sup>	53,20±1,9 <sup>b</sup>	61,40±3,36 <sup>ab</sup>	70,8±7,3 <sup>a</sup>

Medias con por lo menos una letra en común en sentido horizontal no presentan diferencias estadísticas según prueba de tukey, ( $\alpha = .05$ ). **Fuente:** Elaboración propia.

presencia de los pronúcleos masculino y femenino, para los lotes de semen criopreservado previamente de cada uno de los tratamientos evaluados 100%, 50%, 25% y control; los resultados obtenidos indican diferencias significativas para el proceso de fecundación *in vitro*. Los valores mínimos se presentaron en el tratamiento 2 (50%) y los máximos en el tratamiento 1 (100%) y 4 (Control), respectivamente. El comportamiento de los valores obtenidos en los tratamientos 1 (100%) y 4 (control), no fueron estadísticamente diferentes ( $P>0,05$ ).

## Discusión

Los resultados obtenidos en las valoraciones de calidad espermática de los bovinos muestran como en las dos localidades evaluadas, no se mostraron diferencias significativas para las variables consideradas como volumen, concentración, viabilidad y la variable derivada ICE, a diferencia de la variable motilidad que, si señaló cambios significativos. La variable morfología mostró cambios significativos únicamente en las valoraciones de los toros de la localidad del CI La Libertad.

Para el caso de la motilidad, en los toros evaluados en el CI La Libertad, el menor valor se obtuvo en el tratamiento denominado como mezcla 50%, con cambios significativos en los tratamientos con mezcla 25% y 100% de aguas tratadas de la producción de petróleo; y no significativos con el tratamiento control, el cual no presentó diferencias significativas con ningún tratamiento evaluado. El valor obtenido en el tratamiento con mezcla 50% es similar a lo encontrado por Véjarano (2005), en bovinos del alto Magdalena y está por encima del 60% similar a lo publicado por Ruiz Sesma et al., (2010), Burnett et al., (2018), Berg HF et al., (2018), Khalil WA et al., (2018). Los resultados obtenidos para esta misma variable en la localidad del ASA, son similares a lo expuesto anteriormente.

En cuanto a la morfología espermática se encontró que el menor valor de morfología (número de espermatozoides normales por cada 100 espermatozoides evaluados) se obtuvo en el tratamiento control ( $76,67\pm2,06$ ) con cambios significativos con el 100% de agua de producción tratada y con el tratamiento con mezcla 50% y no significativos con el tratamiento

con mezcla 25 %. Sin embargo, los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos aceptados para los machos bovinos; teniendo en cuenta que el semen contiene cierta proporción de espermatozoides morfológicamente anormales, Cardozo *et al.*, (2002), Oliveira L-Z *et al.*, (2012), Berg HF *et al.*, (2018), afirman que el porcentaje de células espermáticas anormales debe ser menor a 25 % del total de los espermatozoides de la muestra.

Las variable Volumen no muestra diferencias significativas entre tratamientos; los promedios mínimos obtenidos para los toros en las dos localidades superan los 5 ml, estando dentro de los parámetros normales reportados por Páez y Corredor (2014), Barszcz, (2012) y con valores similares a los reportados en los estudios de Anchíeta *et al.*, (2005), Ruiz-Sesma *et al.*, (2010) y superior a lo encontrado por Cabrera y Pantoja, (2012).

De igual forma la viabilidad no muestra cambios que indiquen diferencias significativas entre tratamientos y sus promedios obtenidos tanto para la localidad del CI la Libertad como para el ASA, superan los valores reportados por Cabrera y Pantoja (2012), Felipe-Pérez *et al.*, (2008), Nava-Trujillo *et al.*, (2011).

La variable derivada ICE, como anteriormente se resaltó involucra indicadores de motilidad, viabilidad y morfología que permite una mejor apreciación de la evaluación en forma integral de algunas variables de valoración microscópica, muestra que no se ve influenciada entre tratamientos.

La concentración espermática, variable que puede ser vista junto al ICE como puntos integradores de todos los indicadores de evaluación de calidad espermática no mostró diferencias significativas entre tratamientos y sus valores promedios mínimos estuvieron por encima de  $790 \text{ EPZ X } 10^6 / \text{ml}$ , conteos de espermatozoides mayores a 750 millones por mililitros se consideran muy buenos según la escala de evaluación de Youngquist y Therlfall, (2007). Los valores obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Anchíeta *et al.*, (2005), Cabrera y Pantoja (2012) y superiores a los reportados por Ruiz-Sesma *et al.*, (2010)

Por otra parte, si examinamos el análisis de las variables de calidad seminal relacionadas en la tabla 1 y 2, y en especial la concentración y el ICE se puede definir a este nivel, qué para este estudio, no se observan cambios que se asocie al consumo o no consumo del agua tratada de producción.

En las pruebas de evaluación de la calidad espermática *in vitro* tanto para el test de unión espermatozoide

zona pelúcida como para fertilización *in vitro* no se evidenció efecto del consumo de agua de producción tratada entre los tratamientos evaluados. Los resultados obtenidos en las pruebas de fertilización *in vitro* para los tratamientos 100% y control, son comparables a los reportados por Hidaka *et al.*, (2018), Braundmeier *et al.*, (2002) y Blondin *et al.*, (2009) en resultados obtenidos con semen no sexado, y superiores a los reportados por Velásquez *et al.*, (2007).

Finalmente, los valores obtenidos en los cuatro tratamientos para todas las variables evaluadas, las podemos definir que se encuentran dentro de los rangos determinados para toros con buenas condiciones y potencialmente reproductores.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio sobre el efecto del consumo de agua tratada de producción sobre la fertilidad, tanto *In vivo* como *In vitro* de machos bovinos, no muestran cambios que indiquen diferencias significativas, entre los toros reproductores que consumieron y no consumieron agua de producción tratada.

Los valores obtenidos de las variables analizadas en este estudio son comparables a las reportadas en la literatura, en condiciones normales.

## Agradecimientos

A la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia) y a Ecopetrol por la financiación de los recursos para el desarrollo de la investigación en el marco del convenio Agrosavia-Ecopetrol número 5211320.

## Conflictos de interés

Los autores participes de esta publicación realizaron aportes significativos al manuscrito, están de acuerdo y expresan que no existen conflictos de interés en este estudio.

## Referencias

Almansa E, Velásquez JG, Rodríguez GA. Efecto del uso de aguas provenientes de la producción petrolera en actividades agrícolas y pecuarias. Corpoica Cienc Tecnol Agropecu. 2018;19(2):403-420

Anchíeta MC, Vale Filho VR, Colosimo E, Sampaio IBM, Andrade VJ. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2005;57(2):196-204

- Barszcz K, Wiesetek D, Wasowick M, Kupczynska M. Bull semen collection and analysis for artificial insemination. *J Agric Sci.* 2012;4(3):1-10
- Berg HF, Kommisrud E, Bai G, Gaustad ER, Klinkenberg G, Standerholen FB, et al. Comparison of sperm adenosine triphosphate content, motility and fertility of immobilized and conventionally cryopreserved Norwegian Red bull semen. *Theriogenology.* 2018;121:181-187
- Burnett CR, Pratt SL, Long NM, Sell GS, Schrick FN. Assessment of semen quality and fertility in young growing beef bulls exposed to ergot alkaloids. *Theriogenology.* 2018;118:219-224
- Braundmeier AG, Demers J, Shanks R, Saacke R, Miller D. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucida as an indicator of fertility. *J Androl.* 2002;23(5):645-651
- Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin M, Crawford L, Madan P, King WA. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology.* 2009;71: 30-38
- Brito L. A Multilaboratory study on the variability of bovine semen analysis. *Theriogenology.* 2016;85(2):254-266
- Cabrera P, Pantoja C. Viabilidad espermática e integridade del acrosoma em sêmen congelado de bois nacionais. *Rev Investig Vet Perú.* 2012;23(2):192-200
- Cardozo JA, Velásquez JG, Rodríguez G, Prieto E, Tarazona G, Espitia A. 2002. Evaluación reproductiva del macho bovino en condiciones tropicales. Plan de modernización tecnológica de la ganadería colombiana. Manual técnico.
- Chenoweth PJ, McPherson FJ. Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. *Anim Reprod Sci.* 2016;169:32-36
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A. Effect of sperm preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology.* 2010;74: 424-435
- Coy P, Romar R, Payton R, McCann L, Saxton A, Edwards L. Maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes using the S-enantiomer of roscovitine: effects on maturation, fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Reproduction.* 2005;129(1):19-26
- Fair S, Lonergan P. Review: Understanding the causes of variation in reproductive wastage among bulls. *Animal.* 2018;12(s1):s-53-s62. Doi: 10.1017/S1751731118000964
- Felipe-Pérez YE, Juárez ML, Hernández EO, Valencia JJ. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Vet Bras.* 2008;2(4):123-130
- Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, et al. 2014. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology.* 2014;81:1067-1072
- Flowers WL. Sperm characteristics that limit success of fertilization. *J Anim Sci.* 2013;9(7):3022-3029
- Hidaka T, Fukumoto Y, Yamamoto S, Ogata Y, Horiuchi T. Variations in bovine embryo production between individual donors for OPU-IVF are closely related to glutathione concentrations in oocytes during in vitro maturation. *Theriogenology.* 2018;113:176-182
- Kastelic JP, Thundathil JC. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim.* 2008;43(2):368-373
- Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AE, Hassan MA, Mohey-Elsaeed O. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine.* 2018;6:s49-s56
- Oliveira LZ, Paes de Arruda R, Cesar de Andrade AF, Carvalho Celeghini EC, Dos Santos RM, Beletti ME, et al. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livest Sci.* 2012;146:38-46
- Orantes MA, Vilaboa J, Ortega E, Córdova V. Comportamiento de los comercializadores de ganado bovino en la región Centro del estado de Chiapas. Quehacer Científico en Chiapas. 2010;1(9):51-56
- Páez EM, Corredor ES. Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia y Agricultura.* 2014;11(2):49-59
- Parkinson TJ. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Vet J.* 2004;168(3):215-229. Doi:10.1016/j.tvjl.2003.10.017
- Petherick JC. A review of some factors affecting the expression of libido in beef cattle, and individual bull and herd fertility. *Appl Anim Behav Sci.* 2004;90:185-205
- Prinosilova P, Kopecká V, Hlavicová J, Kunetková M. Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. *Acta Vet Brno.* 2014;(83):313-319
- Quintero MA, Mayorga JM, Cardona MW. El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *Journal of veterinary andrology (JVA).* 2017;2(1):30-37
- Restrepo BG, Úsuga SA, Rojano BA. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencia del semen equino. *CES Med Vet Zootec.* 2013;8(1):69-81
- Rosseto A. O uso de sondas fluorescentes na avaliação morfológica de espermatozoides bovinos. *Rev Ciênc Agrár Belém.* 2005;43 junio/julio Suplemento
- Ruiz SB, Ruiz HH, Mendoza NP, Oliva MA, Gutiérrez MF, Rojas MRI, et al. Caracterización reproductiva de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruzas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico mexicano. *Revista científica UDO Agrícola.* 2010;10(1):94-102
- Thundathil JC, Dance AL, Kastelic JP. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology.* 2016;86(1):397-405
- Vejarano OA, Sanabria RD, Trujillo GA. Diagnóstico de la capacidad reproductiva de toros en ganaderías de tres municipios del alto Magdalena. *Rev MVZ Córdoba* 2005;10(2):648-662

- Velásquez JG, Canovas S, Barajas DP, Marcos J, Jiménes-Movilla M, Gutierrez R, et al. Role of Sialic Acid in Bovine Sperm-Zona Pellucida Binding. *Mol Reprod Dev*. 2007;74:617-628
- Velho ALC, Menezes E, Dinh T, Kaya A, Topper E, Moura AA, Melilli E. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *Plos One*. 2018;13(4):e0195279. doi: 10.1371/journal.pone.0195279
- Viana AGA, Martins AMA, Pontes AH, Fontes W, Castro MS, Ricart CAO, et al. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. *Nature*. 2018(8):16323. Doi:10.1038/s41598-018-34152-w
- Yániz JL, Palacín I, Vicente-Fiel S, Gosalvez J, López-Fernández C, Santolaria P. Evaluation of comercial kit base don acridine orange/propidium iodide to assess the plasma membrane integrity of ram sperm. *Span J Agric Res*. 2013;11(2):362-365
- Yániz JL, Palacín I, Caycho KS, Soler C, Silvestre MA, Santolaria P. Determining the relationship between bull sperm kinematic subpopulations and fluorescence groups using an integrated sperm quality analysis technique. *Reprod Fert Develop*. 2018;(30):919-923
- Youngquist RS, Threlfall WR. 2007. *Current therapy in Large Animal Theriogenology. Second edition*. Philadelphia, United States: Elsevier.

José G. Velásquez:<https://orcid.org/0000-0001-8023-1367>  
 José H. Velásquez:<https://orcid.org/0000-0001-7617-6588>  
 Sonia Gutiérrez:<https://orcid.org/0000-0002-8329-8302>  
 Diana Barajas:<https://orcid.org/0000-0002-7604-4734>  
 Eliana Neira:<https://orcid.org/0000-0002-8940-5885>  
 Ciro Ortiz: <https://orcid.org/0000-0003-4538-9083>  
 Héctor Onofre: <https://orcid.org/0000-0002-1891-2652>