

# Determinación del estado antioxidante en sangre, suero y plasma seminal en caninos

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN



Néstor Alonso Villa-Arcila<sup>1</sup>, Alejandro Ceballos-Marquez<sup>1</sup>,  
Paulo César Duque-Madrid<sup>1</sup>, Luis Gabriel Restrepo-Restrepo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sistemas de Producción, Universidad de Caldas,  
Manizales, Colombia.

navilla@ucaldas.edu.co

(Recibido: mayo 27, 2010; aprobado: julio 12, 2010)

**RESUMEN:** En 20 caninos adultos, clínicamente sanos de la ciudad de Manizales, alimentados con alimento balanceado comercial, se realizó un estudio con el fin de conocer la actividad de las enzimas antioxidantes: Glutación Peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) y Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1), en sangre, suero y plasma seminal. Además, la relación de estas enzimas con las características seminales (volumen, motilidad individual, concentración espermática) y la prueba hiposmótica (PH). La GSH-Px presentó una actividad en sangre de 173,0±74,4 Ug/Hb, en suero de 1,3±0,9 U/L y en plasma seminal de 1,0±0,5 U/L. La actividad de la GSH-Px en plasma seminal se correlacionó negativamente con el volumen espermático ( $r = -0,45$ ;  $P=0,04$ ); con las otras variables analizadas no se obtuvieron correlaciones ( $P>0,05$ ). Con respecto a la SOD, en sangre se encontró una actividad de 573,4±171,1 Ug/Hb, en suero de 85,2±28,6 y en plasma seminal de 3,2±1,9 U/ml y una correlación positiva de esta enzima en plasma seminal con la concentración espermática ( $r = 0,47$ ;  $P=0,03$ ). No se obtuvieron correlaciones significativas ( $P>0,05$ ) con las otra variables analizadas. La actividad de las enzimas GSH-Px y SOD en sangre, suero y plasma seminal no se relacionaron con la calidad espermática, excepto la actividad de la SOD en plasma seminal con la concentración espermática; además, la actividad de las enzimas en suero, sangre y plasma seminal no están correlacionadas, lo que sugiere que actúan como sistemas independientes.

**Palabras clave:** dismutasa, espermatozoide, glutation, perro, semen

## Determination of antioxidant status in blood serum and seminal plasma in dogs

**ABSTRACT:** The study was conducted with twenty adult clinically healthy dogs from Manizales, fed with balanced commercial dog food, to know the activity of antioxidant enzymes: glutathione peroxidase (GSH-Px, EC 1.11.1.9) and superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) in blood, serum, and seminal plasma. In addition the relationship of these enzymes with semen characteristics (volume, motility, sperm concentration) and hyposmotic test (PH) were studied. The GSH-Px showed 173.0±74.4 Ug / Hb activity in blood, 1.3±0.9 U/L in serum of and 1.0±0.5 U/L in seminal plasma. The GSH-Px activity in seminal plasma was negatively correlated with sperm volume ( $r = -0.45$ ,  $P=0.04$ ); no correlations were obtained with the other variables tested ( $P>0.05$ ). With regards to SOD, 573.4±171.1 Ug/Hb activity was found in blood, 85.2±28.6 was found in serum and 3.2±1.9 U/mL was found in seminal plasma. A positive correlation of this enzyme in seminal plasma with sperm concentration ( $r = 0.47$ ,  $P=0.03$ ) was also found. There were no significant correlations ( $P>0.05$ ) in the other tested variables. The activity of the GSH-Px and SOD enzymes in blood, serum and seminal plasma were not related to sperm quality, except in SOD activity in seminal plasma with sperm concentration; besides, the activity of enzymes in serum, blood and seminal plasma are not correlated suggesting that they act as independent systems.

**Key words:** dismutase, spermatozoa, glutation, canine, semen

## Introducción

La toxicidad del oxígeno es un desafío inherente a la vida aerobia, debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales causan injurias sobre cualquier molécula biológica (Sikka et al., 1995; Santanam et al., 1998). Existe, sin embargo, un sistema antioxidante que evita tal daño; durante los fenómenos de la inflamación e infección el equilibrio entre ERO y el sistema antioxidante se ve afectado creándose una situación llamada estrés oxidativo (Sikka et al., 1996; Kelso et al., 1997).

Las ERO tienen efectos benéficos como perjudiciales sobre los espermatozoides dependiendo de la naturaleza y concentración de ERO, así como el momento y localización de la exposición; conociendo lo anterior, cuando hay generación excesiva de ERO en el semen se puede producir daño al espermatozoide (Lamirande & Gagnon, 1995; Sikka et al., 1995; Kay & Robertson, 1998).

La presencia de un estado de estrés oxidativo ha estado implicada en la infertilidad del macho, por lo tanto, es importante cuantificar los mecanismos de defensa antioxidante que tienen el plasma seminal y la sangre, con el fin de buscar la mejor estrategia de solución y corregir estos problemas (Aitken & Fisher, 1994; Sánchez, 1997; Armstrong et al., 1999).

Los espermatozoides de los caninos como los de cualquier animal mamífero, contienen poco citoplasma y su membrana es rica en ácidos grasos poliinsaturados, lo que los hace particularmente susceptibles al daño producido por las ERO (Hernández et al., 1995; Suray et al., 1998).

La función defectuosa de los espermatozoides ha estado asociada a un aumento de ERO, ya que estas interrumpen la fusión espermatozoide-ooocito, disminuyen la motilidad espermática, alteran las proteínas y fragmentan el DNA (Lamirande & Gagnon, 1995; Kim & Parthasarathy, 1998); aunque niveles bajos de ERO no afectan la viabilidad del espermatozoide, sí causa

inmovilización y cierto grado de fragmentación del DNA (Lamirande & Gagnon, 1995; Aitken et al., 1996).

El sistema de defensa contra la acción de ERO está formado por antioxidantes biológicos y químicos, entre los primeros está la Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) y la Glutatión Peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) las que actúan respectivamente, sobre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno (Sikka, 1996). La actividad de estas enzimas se relaciona con el aporte de minerales, así, la SOD está asociada al zinc, cobre y manganeso y la GSH-Px se relaciona con el selenio (Marín et al., 1997; Scott et al., 1998; Slaweta et al., 1998).

El objetivo del presente estudio fue en 20 caninos de talla grande determinar el estado antioxidante en sangre, suero y plasma seminal, determinando la actividad de la SOD y de la GSH-Px y correlacionar esta con la evaluación seminal y una prueba hiposmótica (PH).

## Materiales y Métodos

Se seleccionaron 20 caninos de la ciudad de Manizales (5° 4' latitud norte y 75° 3' de Greenwich) con edades entre 2 y 7 años, clínicamente sanos, en actividad reproductiva y alimentados a base de alimento balanceado comercial para caninos.

**Muestras.** A cada canino se le tomó una muestra de semen mediante masturbación recolectando la fracción preespermática y espermática, según el método descrito por Olson (1994), y una muestra de sangre mediante venopunción de la vena cefálica usando tubos al vacío con heparina y tubos sin anticoagulante para extraer el suero.

La evaluación seminal incluyó volumen, concentración, motilidad masal y motilidad individual (Olson, 1994). Además, se practicó a cada una de las muestras una prueba hiposmótica (PH) en medios de citrato de sodio a 100 y 150 mOsm de acuerdo al protocolo descrito

por Rodríguez et al. (1993). Luego, el semen se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm para separar el plasma seminal; este se conservó congelado hasta la determinación de la actividad de las enzimas.

La sangre con heparina se llevó al laboratorio para la determinación de la hemoglobina y luego se hicieron para cada enzima las diluciones correspondientes; la muestra sin anticoagulante se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm para separar el suero, este se conservó congelado hasta la determinación de la actividad de las enzimas.

La preparación para la medición de SOD se basó en tres lavados de los eritrocitos con solución salina, los cuales fueron posteriormente lisados. Las diluciones fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación de la SOD y la GSH-Px. La actividad de las enzimas se analizó utilizando paquetes comerciales (Ransel<sup>®</sup> y Ransod<sup>®</sup>; Randox Lab., Crumlin, UK).

**Análisis.** La actividad de la GSH-Px se determinó mediante un método cinético compuesto de NADPH-dependiente tanto para sangre y suero (Ceballos, 1996) como para plasma seminal (Villa et al., 1999a), mientras que la actividad de la SOD se hizo mediante un método colorimétrico de punto final, igual para sangre, suero (Randox,

1997) y plasma seminal (Villa et al., 1999b) según los protocolos específicos.

**Estadística.** Para el análisis de los datos se empleó estadística descriptiva, calculando media  $\pm$  desviación estándar, rango e intervalo de confianza IC (95%); los rangos de referencia para la actividad de la GSH-Px y SOD en sangre, suero y plasma seminal se determinaron mediante el método de los promedios. Además, se establecieron correlaciones simples entre la actividad de las enzimas en sangre, suero y plasma seminal con las características seminales y con la PH, fijando como nivel de significancia  $P=0,05$ .

Se utilizó la prueba "T" de Student para determinar si había diferencias entre los dos medios hiposmóticos empleados después de 30 minutos de incubación.

## Resultados y Discusión

### Glutación peroxidasa

El promedio de actividad de la GSH-Px en sangre, suero y plasma seminal en los caninos de estudio se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Actividad de la GSH-Px en sangre, suero y plasma seminal en 20 caninos adultos de la ciudad de Manizales.

	Media $\pm$ D.E.	Rango	Intervalo de confianza
Sangre Ug/Hb	173 $\pm$ 4,5	71-304,8	98,5-247,5
Suero Ug/Hb	1,3 $\pm$ 0,9	0,1-2,7	0,4-2,2
Plasma seminal U/L	1,0 $\pm$ 0,5	0,1-1,9	0,5-1,5

Al correlacionar la actividad de la enzima con las características seminales, se encontró una correlación negativa ( $r = -0,453$ ;  $P=0,044$ ) entre la actividad de la GSH-Px en plasma seminal con el volumen espermático. No se encontró correlación con las demás variables analizadas.

En la actividad de la GSH-Px en sangre de los caninos estudiados al ser relacionada con reportes de otras especies, se encuentra que se presenta menor actividad que la hallada para bovinos de la raza Brahman ( $299\pm 137$  Ug/Hb; Villa et al., 1999a) y porcinos ( $217,3\pm 48,3$  Ug/Hb; Villa et al., 1999b).

La actividad en plasma seminal de GSH-Px (Tabla 1) fue menor con respecto a otras especies reportadas, como toros Brahman ( $1,6 \pm 1,8$  U/L; Villa et al., 1999a) y porcinos (Villa et al., 1999b), y mayor relacionándola con equinos ( $0,1 \pm 0,1$  U/L; Salazar et al., datos sin publicar).

Los alimentos comerciales de uso más frecuente en el país, no contienen selenio (Se), lo cual puede ser un factor para que se encuentre la actividad de esta enzima en cantidad inferior que en bovinos, equinos y porcinos, ya que el Se forma parte estructural de la GSH-Px. Iwanier & Zachara (1995), suplementaron con Se a dos grupos de personas y observaron que la concentración de GSH-Px aumentó tanto en sangre como en plasma seminal, pero las características seminales no mejoraron.

Se encontró correlación negativa entre la actividad de la GSH-Px en plasma seminal y volumen seminal, lo que nos sugiere que esta enzima no es de origen prostático ya que esta glándula determina el volumen del eyaculado.

En el hombre, Yeung et al. (1998) estudiaron el origen de las enzimas antioxidantes y su relación con resultados de fertilización *in vivo*, determinando que en la próstata se produce gran parte de las enzimas antioxidantes. Esta relación negativa también puede ser debida al efecto de dilución del líquido prostático sobre la enzima; en porcinos, Villa et al. (1999b) encontraron esta misma situación, pero en la correlación de la SOD en plasma seminal y volumen espermático.

Al no encontrarse ninguna correlación entre la actividad de la GSH-Px en sangre, suero y plasma seminal, se sugiere que estas actúan como sistema independiente, sin embargo, Iwanier & Zachara (1995) dicen que la actividad de la GSH-Px es influenciada por el aporte de Se.

### Superóxido dismutasa

El promedio de actividad de la SOD en sangre, suero y plasma seminal en los caninos de estudio se describe en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Actividad de la SOD en sangre, suero y plasma seminal en 20 caninos adultos de la ciudad de Manizales.

	Media $\pm$ D.E	Rango	Intervalo de confianza
Sangre Ug/Hb	$573,4 \pm 171,1$	269 – 984	402,3 – 744,5
Suero Ug/Hb	$85,2 \pm 28,6$	54,2 – 167,3	56,6 – 113,8
Plasma seminal U/L	$3,2 \pm 1,9$	0 – 6,6	1,3 – 5,1

Se correlacionaron la actividad de la SOD en sangre, suero y plasma seminal, con las características seminales, dando como resultado una correlación positiva entre la actividad de esta enzima en semen con la concentración espermática ( $r = 0,473$ ;  $P=0,034$ ).

La actividad de SOD en sangre de los caninos evaluados (Tabla 2), estuvo por debajo de las especies reportadas en trabajos anteriores; estos fueron los resultados encontrados: toros Brahman  $1196 \pm 645$  Ug/Hb (Villa et al., 1999a), equinos  $1877 \pm 940,2$  Ug/Hb (Salazar et al., datos sin publicar), porcinos  $1005 \pm 490,1$  Ug/Hb (Villa et

al., 1999b). En humanos los valores de referencia para la SOD oscilan entre 50 a 200 U/ml (Lipecka et al., 1986), rango dentro del cual se encuentra el valor hallado en caninos ( $105,8$  U/ml).

La actividad de la SOD en plasma seminal en caninos (Tabla 2), fue inferior a la observada por Cassani et al. (2004), quienes hallaron una actividad de esta enzima de  $27,8 \pm 10,8$ . Se encuentra menor que para los toros Brahman ( $5,7 \pm 4$  U/ml; Villa et al., 1999a), equinos ( $199 \pm 138$  U/ml; Salazar et al., datos sin publicar) y humanos ( $6,9 \pm 2,8$  U/ml; Gavella et al., 1996) y mayor que en porcinos ( $2,1 \pm 1,8$  U/ml; Villa et al., 1999b).

La baja actividad de la SOD probablemente sea inherente a los caninos, ya que ellos poseen el sustrato (cobre, zinc y manganeso) para la producción de SOD. Lo anterior, indica que la defensa antioxidante puede partir de otros sistemas como las catalasas, los ubiquinoles (sin: coenzima Q), vitaminas como la E y la C (Sikka, 1996), zinc (Gavella et al., 1999) o albúmina (Twigg et al., 1998). Además, en cuatro animales no hubo actividad de la SOD, sin embargo, las características seminales se encontraron normales.

Se encontró correlación positiva entre la actividad enzimática de la SOD en plasma seminal con la concentración espermática; esta misma correlación fue encontrada por Gavella et al. (1996), lo que sugiere que gran parte de la SOD en plasma seminal se origina del espermatozoide o que los espermatozoides estimulan la producción de SOD para protegerse del daño producido por las ERO.

En un estudio realizado en caninos, a los cuales se les realizó un tratamiento con dexametasona y se suplementó con vitamina E oral, se encontró que en el tratamiento con dexametasona se reduce significativamente el volumen eyaculado y aumentan las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el plasma seminal. En contraste, la suplementación con vitamina E aumentó la motilidad del espermatozoide, el vigor y la concentración, disminuyendo a su vez los principales problemas morfológicos en los espermatozoides (Hatamoto et al. 2006).

En la prueba hiposmótica no se encontraron diferencias significativas con 100 mOsm y 50 mOsm ( $P < 0,05$ ), igual que lo encontrado por Rodríguez et al. (1993). Además, características seminales (Tabla 3) se encuentran entre los rangos normales reportados (Rodríguez et al., 1993; Olson, 1994) para la especie.

**Tabla 3.** Características seminales de 20 caninos adultos de la ciudad de Manizales.

	<b>Media <math>\pm</math> D.E</b>	<b>Rango</b>	<b>Intervalo de confianza</b>
Volumen (ml)	3 $\pm$ 1,8	1 – 7,7	1,2 – 4,8
Motilidad (%)	76,2 $\pm$ 4,2	70 – 80	72 – 80,4
Concentración ( $10^6$ /ml)	158 $\pm$ 126,7	45 – 515	31,3 – 284,7
Tinción nigrosina eosina (vivos)	90,7 $\pm$ 8,4	66 – 100	82,3 – 99,1
Prueba hiposmótica (%) (dilatados) (100 mOsm)	73,3 $\pm$ 8,7	59 – 90	65 – 82,4
Prueba hiposmótica (%) (dilatados) (150 mOsm)	69,7 $\pm$ 9,9	57 – 83	59,8 – 79,6

### Características seminales

En la Tabla 3 se pueden observar las características seminales de los caninos evaluados.

### Prueba hiposmótica

El porcentaje de dilatación de los espermatozoides sometidos a una solución hiposmótica de 100 y 150 mOsm fue de 73,7 y 69,7%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre la PH a concentración de 100 mOsm y 150 mOsm

( $P > 0,05$ ). Infortunadamente no se encontraron antecedentes de literatura que permitan confrontar los resultados de la prueba hiposmótica con las enzimas antioxidantes estudiadas en semen canino.

### Conclusiones

La actividad de las enzimas GSH-Px y SOD en sangre, suero y plasma seminal no se relacionaron con la calidad espermática de los caninos,

excepto la actividad de la SOD en plasma seminal con la concentración espermática. La defensa antioxidante en sangre, suero y plasma seminal actúan como sistemas independientes, ya que no se encontró correlación entre la actividad de GSH-Px y SOD en sangre, suero y plasma seminal.

### Referencias Bibliográficas

- Aitken, R.J.; Buckingham D.W.; Carreras, A.; Irvine, D.S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(4), p.495-504, 1996.
- Aitken, R.J.; Fisher, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. *BioEssays*, 16, p.259-267, 1994.
- Armstrong, J.S.; Rajasekaran, M.; Chamulitrat, W.; Gatti, P.; Hellstrom, W.J.; Sikka, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), p.869-880, 1999.
- Cassani, P.; Beconi, M.T.; Flaherty, C. relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, diamics and morphological parameters in canine semen. *Animal Reproduction Science*, 86, p.163-173, 2005.
- Ceballos, A. **Actividad sanguínea de GSH-PX como indicador de Estrés Metabólico Nutricional de SE en rebaños lecheros**. Valdivia, Chile: Universidad Austral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Ciencias Veterinarias, 1996.
- Gavella, M.; Lipovac, V.; Vucic, M.; Rocic, B. Superoxide anion scavenging capacity of human seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 19(2), p.82-90, 1996.
- Gavella, M.; Lipovac, V.; Vucic, M.; Sverko, V. In vitro inhibition of superoxide anion production and superoxide dismutase activity by zinc in human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 22(4), p.266-274, 1999.
- Griveau, J.F.; Lannou, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*, 20(2), p.61-69, 1997.
- Hatamoto, L.K.; Baptista, C.A.; Nichi, M.; Barnabe, V.H.; Barnabe, R.C.; Cortada, C.N. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology*, 66(6-7), p.1610-1614, 2006.
- Hernández, S.R.; Guzmán, A.M.; Hicks, J.J. Oxygen reactive species in spermatozoa. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 63, p.50-54, 1995.
- Iwanier, K.; Zachara, B.A. Selenium supplementation enhances the element concentration in blood and seminal fluid but does not change the spermatozoal quality characteristics in subfertile men. *International Journal of Andrology*, 16(5), p.441-447, 1995.
- Kay, V. ; Robertson, L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Human Reproduction*, Update, 4(6), p.776-786, 1998.
- Kelso, K.A.; Redpath A.; Noble, R.C.; Speake, B.K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109(1), p.1-6, 1997.
- Kim, J.G.; Parthasarathy, S. Oxidation and the spermatozoa. *Semin. Reprod. Endocrinol.*, 16(4), p.235-239, 1998.
- Lamirande, E.; Gagnon, C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(3), p.487-495, 1995.
- Lipecka, K.; Grabowska, B.; Daniszewska, K. Enzymatic activity of superoxide dismutase in lymphocytes and erythrocytes in people of different ages. *Med. Pr.*, 37(5), p.305-308, 1986.
- Marin, J.; Mahan, D.C.; Chung, Y.K.; Pate, J.L.; Pope, W.F. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissues responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in matures gilts. *Journal of Animal Science*, 75(11), p.2994-3003, 1997.
- Olson, P.N. Recolección y evaluación del semen canino. Kirk Bonagura. *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*. Madrid: Interamericana - McGraw-Hill, 1994. p.1039-1044.

- Rodríguez, J.E.; Montserrat, A.; Rigau, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, 42, p.815-829, 1993.
- Sánchez, R.G. Estrés oxidativo y fertilidad. En: Estrés oxidativo y antioxidantes en la Salud y Nutrición Animal. **Curso-seminario**. Editores: Wittwer, F.M., Ceballos, A.M. Valdivia, 1997. p.4-7.
- Santanam, N.; Ramachandran, S.; Parthasarathy, S. Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, 16(4), p.275-280, 1998.
- Scott, R.; Macpherson, A.; Yates, R.W.; Hussain, B.; Dixon, J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. **Br. Journal of Urology**, 82(1), p.76-80, 1998.
- Sikka, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal spermfunction. **Front. Biosci.**, 1, 78-86, 1996.
- Sikka, S.C.; Rajasekaran, M.; Hellstrom, W.J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, 16(6), p.464-481, 1995.
- Slaweta, R.; Laskowska, T.; Szymanska, E. Lipid peroxides, spermatozoa quality and activity of glutathione peroxidase in bull semen. **Acta Physiol. Pol.**, 39(3), p.207-214, 1998.
- Surai, P.F.; Blesbois, E.; Grasseau, I.; Chalah, T.; Brillard, J.P.; Wishart, G.J.; Cerolini, S.; Sparks, N.H. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. **Comp. Biochem Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, 120(3), p.527-533, 1998.
- Twigg, J.; Fulton, N.; Gomez, E.; Irvine, D.S.; Aitken, R.J. 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), p.1429-1436, 1998.
- Villa, N.A.; Ceballos, A.; Correa, S.; López, E.; Salazar, J. Evaluación del estado antioxidante en plasma seminal en toros Brahman (*Bos indicus*) en pastoreo y suplementados. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, 12, 187, 1999a (suplemento).
- Villa, N.A.; Ceballos, A.; Sánchez, L.; Salazar, J.I.; Sánchez, L.E.; Sánchez, R.; Gómez, A.M. **Determinación del estado antioxidante en sangre y plasma seminal en porcinos**. Manizales, Colombia: Universidad de Caldas, 1999b. Tesis (Médico Veterinario Zootecnista).
- Yeung, C.H.; Cooper, T.G.; De Geyter, M.; De Geyter, C.; Rolf, C.; Kamischke, A.; Nieschlag, E. Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro fertilization. **Mol. Human Reproduction**, 4(9), p.835-839, 1998.