



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LA TOXICIDAD DIRECTA DEL FIPRONIL SOBRE
ESPERMATOZOIDES BOVINOS DESCONGELADOS**

“por”

Bruno ARBIZA NIMER

Juan Manuel LUCERO de VARGAS

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias

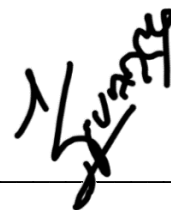
Orientación: PRODUCCION ANIMAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2023**

PAGINA DE APROBACION

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Gonzalo Suárez

Segundo Miembro (Tutor):



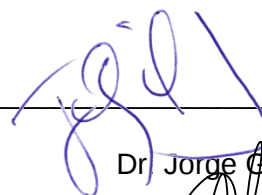
Dra. María Florencia Puigvert Manassi

Tercer Miembro:

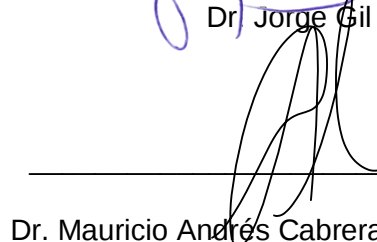


Dra. Carmen García y Santos

Cuarto miembro (Co-tutor):



Dr. Jorge Gil Laureiro



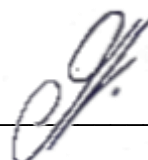
Dr. Mauricio Andrés Cabrera Cedrés

Fecha: 18/12/2023.

Autores:



Br. Bruno Arbiza Nimer



Br. Juan Manuel Lucero de Vargas

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora Dra. María Florencia Puigvert, y co-tutores Dres. Jorge Gil y Mauricio Cabrera, por haber depositado toda su confianza, apoyo incondicional y paciencia para ayudarnos a completar este ciclo.

A la Dra. Victoria Pons, por dedicarnos su tiempo para contribuir en este trabajo.

Al personal de Biblioteca de Facultad de Veterinaria por su ayuda en la búsqueda de bibliografía.

A nuestras familias por su apoyo constante e incondicional, a los que están, y a los que ya no lo hacen físicamente.

A amigos y compañeros que nos han acompañado en este camino.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

PAGINA DE APROBACION	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCION	8
REVISION BIBLIOGRAFICA	10
1. RECUERDO ANATOMICO DEL APARATO REPRODUCTOR DEL TORO.....	10
1.1. Testículos y escroto	10
1.2. Epidídimo	11
1.3. Cordón espermático	11
1.4. Pene	11
1.5. Órganos sexuales accesorios	12
2. ESPERMATOGENESIS Y ENDOCRINOLOGIA DEL TORO	12
2.1. Espermatozoides	12
2.2. Espermatogénesis, espermiación y eyaculación	13
2.3. Control endócrino	14
3. PROCESAMIENTO Y EVALUACION DEL SEMEN BOVINO	15
3.1. Colección y preservación seminal	15
3.2. Pruebas macroscópicas de evaluación seminal	16
3.2.1. Volumen	16
3.2.2. Aspecto	16
3.2.3. Olor	16
3.2.4. Color	16
3.2.5. Motilidad en masa macroscópica	17
3.2.6. Ph	17
3.2.7. Cuerpos extraños	17
3.3. Pruebas microscópicas de evaluación seminal	17
3.3.1. Motilidad en masa microscópica	17
3.3.2. Densidad	18
3.3.3. Motilidad individual	18
3.3.4. Vigor	19
3.3.5. Concentración	19
3.4. Determinación de anomalías espermáticas	20
3.5. Análisis de calidad seminal <i>post</i> descongelado	21
4. FIPRONIL	22
4.1. Principales características	22
4.2. Propiedades fisicoquímicas	23
4.3. Farmacocinética	23
4.4. Farmacodinamia	24
4.5. Toxicología	24
5. HIPOTESIS	26
6. OBJETIVOS	26
7. MATERIALES Y METODOS	26
8. RESULTADOS Y DISCUSION	28
9. CONCLUSIONES	32
10. BIBLIOGRAFIA	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Aspecto del eyaculado correlacionado a la concentración espermática con la asignación de un valor descriptivo para cada caso.....	16
Tabla 2. Valoración de la motilidad masal macroscópica de eyaculados bovinos. ..	17
Tabla 3. Escala de la motilidad en masa microscópica.	18
Tabla 4. Correlación entre concentración y densidad espermática.	19
Tabla 5. Escala del vigor del movimiento ondulado de los espermatozoides.....	19
Tabla 6. Parámetros cinemáticos más comunes proporcionados por el análisis de espermatozoides asistido por ordenador	22
Tabla 7. Clasificación toxicológica y etiquetado de plaguicidas de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS).....	25
Tabla 8. Clasificación de población de espermatozoides de toro según patrón de movimiento basada en los umbrales del perfil del toro del sistema CASA de Minitube.	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los principales órganos del tracto reproductivo de un bovino macho (adaptado de Senger, 2005).	10
Figura 2. Esquema de un espermatozoide bovino y sus partes anatómicas (Hidalgo, Tamargo Miguel & Diaz Monforte, 2005).	13
Figura 3. Estructura química del Fipronil (Jackson, Cornell, Luukinen, Buhl & Stone, 2009).	23

RESUMEN

En la actualidad, con la utilización de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial (IA), la fertilidad individual del macho es clave para el éxito reproductivo de los sistemas ganaderos. En Uruguay, una importante causa de pérdidas económicas, tanto directas como indirectas, es la parasitosis causada por la garrapata común del ganado (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*), por ello la implementación de planes sanitarios que incluyan fármacos ectoparasiticidas es una práctica muy difundida en los establecimientos ganaderos. El tratamiento generacional de garrapatas coincide con el inicio del entore tradicional, y uno de los principios activos más utilizados históricamente en nuestro país es el Fipronil. Sin embargo, existen múltiples publicaciones que evidencian la toxicidad de este fármaco en animales experimentales. Diversos estudios revelan el aumento de patologías espermáticas con disminución en la motilidad y viabilidad celular debido a la presencia de trazas de este compuesto. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar y comparar el efecto del Fipronil en estado puro sobre la supervivencia y cinética de espermatozoides bovinos descongelados. Se realizó un ensayo experimental usando un modelo de citotoxicidad *in vitro*, en el cual se incubaron células a dos tiempos de exposición (20 y 40 minutos) con Fipronil en estado puro en su máxima solubilidad (4,35 μM). Se evaluaron parámetros cinemáticos de importancia (motilidad progresiva (%PROG), velocidad media (VAP), velocidad curvilínea (VCL), frecuencia de cruce de trayectoria (BCF), índice de oscilación (WOB), índice de linealidad (LIN), e índice de rectitud (STR)) mediante un analizador de semen asistido por computadora (CASA). Los resultados obtenidos mostraron que no se registraron diferencias significativas para ninguno de los parámetros evaluados en los tiempos de exposición. Se concluyó que la calidad biológica y cinética espermática del semen descongelado de toro no fue afectado cuando se lo expuso a Fipronil en estado puro en su máxima solubilidad.

SUMMARY

Nowadays, with the use of reproductive biotechnologies such as artificial insemination (AI), individual male fertility is crucial for the reproductive success of livestock systems. In Uruguay, a major cause of economic losses, both direct and indirect, is parasitosis caused by the common cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). For this reason, the implementation of health plans that include ectoparasitis drugs is a widespread practice in livestock establishments. The generational treatment of ticks matches with the beginning of the traditional bovine reproductive season. One of the active ingredients most historically used in our country is Fipronil. Nevertheless, there are multiple publications that show the toxicity of this drug in experimental animals. Various studies reveal the increase in sperm pathologies with a decrease in motility and cell viability due to traces of this compound. In this context, the aim of the present work was to evaluate and compare the effect of pure Fipronil on the survival and kinetics of thawed bovine sperm. An experimental test was carried out using an in vitro cytotoxicity model, in which cells were incubated at two exposure times (20 and 40 minutes) with pure Fipronil at its maximum solubility (4.35 μM). Important kinematic parameters were evaluated (progressive motility (%PROG), average velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), trajectory crossing frequency (BCF), oscillation index (WOB), linearity index (LIN), and straightness index (STR)) using a computer-assisted semen analyzer (CASA). The results showed that no significant differences for any of the parameters evaluated in the exposure times was recorded. In conclusion, that the biological and sperm kinetic quality of thawed bull semen was not affected when it was exposed to Fipronil in its pure state at its maximum solubility.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es un pilar fundamental en la producción ganadera. La eficiencia de este parámetro productivo está determinada por el número de terneros destetados en relación a las vacas entoradas, y es el resultado, entre otros factores, de la interacción entre la fertilidad del macho y de la hembra. En el servicio natural la relación toro/vaca varía en un rango de entre 25 – 50 hembras por cada toro, aumentando significativamente cuando se implementan biotecnologías como la inseminación artificial (IA), en cuyo caso esa relación podría aumentar a 1/10.000 o más (Boggio Devincenzi, 2007). Es por tal razón que la fertilidad individual del macho es clave para el éxito reproductivo. En este contexto, un punto crítico a tener en cuenta, y que muchas veces pasa desapercibido, es el efecto secundario de los fármacos y/o sus metabolitos que están incluidos normalmente en los planes sanitarios de los predios agropecuarios.

La utilización de plaguicidas para el control químico de parásitos es una práctica muy difundida en Uruguay, y la garrapata común del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es uno de los principales objetivos (Zaccarelli Magalhães, Meira Sandini, Sayuri Berto Udo, Rinaldi Fukushima & de Soza Spinosa, 2018).

R. microplus es responsable de una de las parasitosis más importantes en el país y la región, ocasionando pérdidas económicas directas estimadas en 32 a 46 millones de dólares anuales aproximadamente. Asimismo, produce importantes pérdidas indirectas como merma de peso, transmisión de enfermedades (tristeza parasitaria) y costos devenidos por campañas sanitarias para su combate y erradicación (Miraballes, Riet-Correa, Fuellis & Araoz, 2018).

Es por ello que, el Fipronil, se ha convertido en un principio activo de extenso uso en animales (Zaccarelli Magalhães *et al.*, 2018). Sin embargo, la legislación actual uruguaya establece ciertas restricciones respecto a sus usos y concentraciones, siendo prohibida además su aplicación en agricultura. El Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) resolvió que “*Únicamente podrá autorizarse la comercialización y uso en el país de productos veterinarios formulados en base a Fipronil, a una concentración no superior a 10% de ingrediente activo, y solo para la aplicación en animales, según indicación terapéutica*” (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2012).

El Fipronil es un plaguicida perteneciente a la familia de los fenilpirazoles. Actúa a nivel del sistema nervioso central (SNC) de invertebrados anulando el efecto neuroregulador del ácido gammaaminobutírico (GABA), el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC. Esto genera una menor entrada de cloro (Cl⁻) a la neurona dando como resultado una hiperexcitación del parásito que culmina en su muerte. Este compuesto se caracteriza por una alta lipofilicidad permitiendo que se deposite en las glándulas sebáceas tras su aplicación tópica en la epidermis, desde donde es liberado gradualmente, obteniendo así un efecto prolongado en el tiempo (Rubio & Boggio, 2009). Según la clasificación toxicológica de plaguicidas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), este fenilpirazol se encuentra dentro de la clase II “moderadamente peligroso” para los seres humanos. A pesar de ser considerado seguro para su uso en animales (Mazzo, Balieira, Bizerra & Mingatto, 2018), existen múltiples publicaciones que demuestran la toxicidad en animales de experimentación (Ohi,

Dalsenter, Andrade & Nascimento, 2004; Dias de Medeiros, Constantin, Ishii-Iwamoto & Mingatto, 2015; Merkowsky, Sethi, Gill, & Singh, 2016; Šefčíková *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019) y de vida salvaje (Gibbons, Morrissey & Mineau, 2015). Otros autores, encontraron disminución en la producción de esperma y en la fertilidad de ratas previamente expuestas a este fármaco (Mazzo *et al.*, 2018); y reducción de la motilidad y viabilidad junto con un aumento concomitante de patologías espermáticas y aparición de problemas acrosómicos (Khan, Jan, Kumar & Telang, 2015). Asimismo, existen otros ensayos que sugieren que el Fipronil puede suprimir directa o indirectamente varias funciones de los espermatozoides, afectando negativamente la fertilidad en mamíferos. Estudios recientes han informado que el GABA y su receptor (GABA_{AR}), están presentes en los espermatozoides humanos y están involucrados en la capacitación e hiperactivación de la motilidad espermática (Bae & Kwon, 2020).

A pesar de estos reportes, la información disponible actualmente sobre los efectos del Fipronil en la fertilidad potencial de toros es escasa. Cuando se manipulan o administran productos veterinarios es de suma importancia conocer que existe la posibilidad de aparición de efectos adversos o secundarios en los animales, y que el uso de los mismos puede dejar residuos a niveles trazas (partes por millón o partes por billón, mg/kg y µg/kg respectivamente). La escasa bibliografía disponible y el hecho de que el tratamiento generacional de la garrapata que se realiza en nuestro país coincide con el inicio del entore tradicional en la mayoría de los rodeos de cría (fines de primavera y verano), motivaron el planteamiento del estudio del efecto de la toxicidad directa de Fipronil sobre la viabilidad y calidad de espermatozoides bovinos descongelados.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. RECUERDO ANATÓMICO DEL APARATO REPRODUCTOR DEL TORO

El aparato reproductor del macho está conformado por órganos sexuales principales (testículos), secundarios (epidídimos, conductos eferentes y deferentes, y pene) y accesorios (glándula prostática, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales o de Cowper) (Salisbury, VanDemark & Lodge, 1978; Hafez, 2000). En la **Figura 1** se muestra un esquema de los principales órganos sexuales del toro.

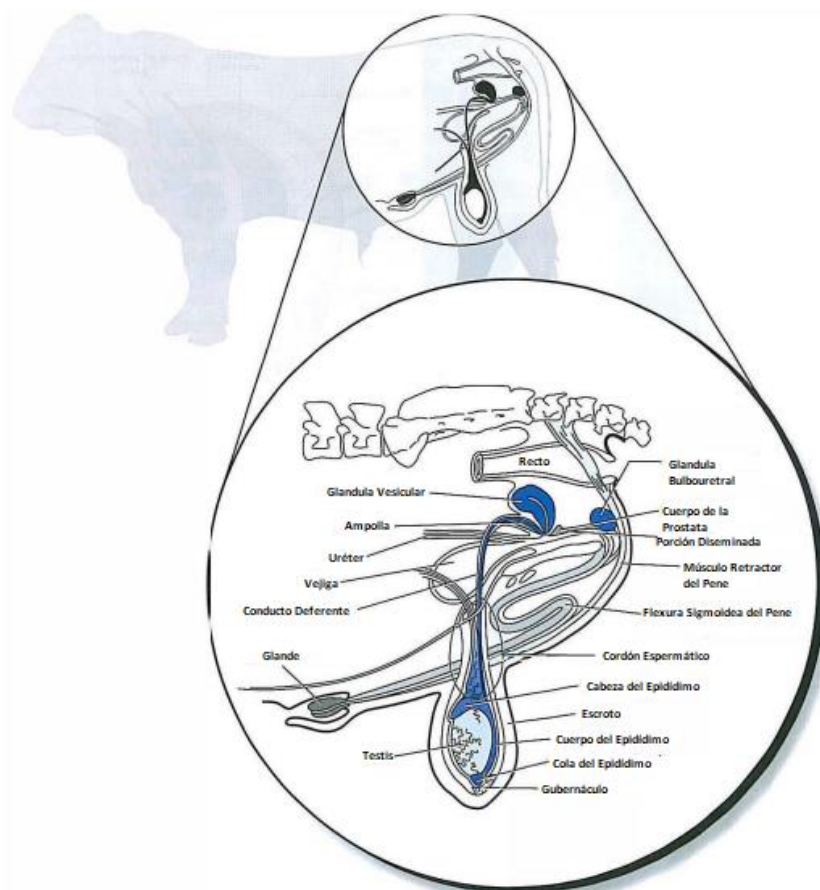


Figura 1. Esquema de los principales órganos del tracto reproductivo de un bovino macho adaptado de Senger 2005.

1.1. Testículos y escroto

Los testículos son órganos pares que conforman a las gónadas masculinas. En los machos sexualmente maduros, cumplen dos funciones principales: producción de espermatozoides vivos potencialmente fértiles y formación de andrógenos, las hormonas sexuales testosterona (T) y androstenediona. En los mamíferos, se hallan localizados en una bolsa externa bilobulada llamada escroto. Este cumple la función de soporte y protección a la vez que colaboran con la termorregulación ayudando así a mantener una temperatura más baja que la del interior del abdomen, necesaria para una espermatogénesis adecuada. Los testículos, además, se encuentran envueltos por una gruesa cápsula de tejido conjuntivo denso que se conoce como túnica albugínea, formada principalmente por series entremezcladas de fibras de colágeno (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez, 2002). De esta túnica se forma la *rete testis*, el

mediastino testicular que contiene vasos sanguíneos y conductos eferentes. El resto del parénquima del órgano está conformado por túbulos seminíferos, tejido conjuntivo laxo muy vascularizado y distintos tipos celulares como las células intersticiales de Leydig. Los túbulos seminíferos son estructuras tubulares contorneadas que se rodean de una lámina basal gruesa. Contienen células de dos tipos: la célula de Sertoli y las células de la línea germinal o células espermatogénicas (Ungerfeld, 2002).

1.2. Epidídimo

El epidídimo es un conducto que surge de los eferentes situándose en la parte dorsal del testículo. Se divide macroscópicamente en tres partes: cabeza, cuerpo y cola. Las dos primeras se encargan de la maduración de los espermatozoides, la cual genera un aumento de su motilidad potencial a medida que van transitando por ellas. Mientras que la cola actúa de reservorio hasta la eyaculación, siendo el principal órgano de almacenamiento. Ésta contiene alrededor del 75% de las células espermáticas que se alojan en el epidídimo. En la cola de epidídimo comienza el conducto deferente que se ensancha formando a la ampolla del deferente. Cada una de estas ampollas entra en la uretra por una abertura común con la vesícula seminal del mismo lado. Aquí se almacena la porción espermática que procede de los testículos y del epidídimo, constituyendo sólo una pequeña parte de las reservas extragonadales totales de espermatozoides (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez, 2002).

1.3. Cordón espermático

El cordón espermático se extiende desde el anillo inguinal hasta su unión en el polo dorsal del testículo. Proporciona un camino hacia y desde el cuerpo para la vasculatura testicular, vasos linfáticos y nervios, a la vez que alberga al conducto deferente, el músculo cremáster y a un sistema vascular especializado denominado plexo pampiniforme (Senger, 2005).

1.4. Pene

El pene es el órgano copulador del macho. Se compone de tres partes: la base que es donde se une al arco isquiático; el eje, la parte principal; y el glande, que corresponde al extremo distal y cuya estimulación es el principal factor para iniciar los mecanismos de la eyaculación. El pene del toro es de tipo fibroelástico y se caracteriza por presentar una flexura sigmoidea con forma de “s” que permite su retracción dentro del cuerpo cuando está en reposo. El cuerpo del pene está formado por dos cuerpos cavernosos, ubicados dorsalmente, y un cuerpo esponjoso por ventral. Este último, se halla atravesado por la uretra, que es la vía común de la orina, las secreciones sexuales y los espermatozoides. La erección se produce por una combinación de la relajación de los músculos retractores del pene y el flujo de la sangre en los cuerpos cavernosos y esponjoso. El extremo libre de este órgano se sitúa en el interior del prepucio, que es la piel que lo protege cuando está en estado de reposo (Salisbury, *et al.* 1978; Hafez, 2000; Senger, 2005).

1.5. Órganos sexuales accesorios

Los órganos sexuales accesorios comprenden las vesículas seminales, la próstata, y las glándulas bulbouretrales (Arthur, Noakes & Pearson, 1991). Conjuntamente, con las ampollas del deferente, proporcionan la mayor parte del plasma seminal cuya función es el mantenimiento de los procesos vitales de los espermatozoides a la vez que actúa como solución tampón (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez, 2000). El plasma seminal es un fluido complejo que conforma la mayor parte del volumen total del semen. Sus diferentes componentes no se limitan a un mismo origen o glándula, y además existe una gran variación entre individuos. Los iones que se encuentran en mayor abundancia son el sodio (Na) y el potasio (K), y en menor medida el zinc (Zn), hierro (Fe) y cobre (Cu). Otros componentes del plasma seminal son prostaglandinas y otras hormonas, enzimas, proteínas, péptidos y aminoácidos, fosfolípidos, lípidos, carnitina, y ácidos pirúvico, láctico y ascórbico (Ungerfeld, 2002).

Las vesículas seminales de rumiantes son glándulas compactas y lobuladas que se encuentran en posición lateral respecto a las porciones terminales de cada conducto deferente en donde comparten un conducto eyaculador común que se abre en la uretra (Hafez, 2002).

La próstata bovina presenta dos partes: un cuerpo y una porción diseminada. El cuerpo es pequeño y se encuentra rodeando a la uretra por detrás de las glándulas vesiculares, mientras que la porción diseminada está íntimamente relacionada con la uretra pélvica distribuyéndose a largo de sus paredes laterales y parte dorsal (Hafez, 2002; Senger, 2005).

Las glándulas bulbouretrales están situadas a ambos lados de la uretra pelviana, por detrás de la próstata y se hallan parcialmente enterradas en el musculo bulbo cavernoso. Cada una de ellas vierte su secreción en la uretra a través de un orificio simple. Producen una sustancia acuosa lubricante y viscosa con aspecto de moco que se elimina antes del coito y cuya función es “limpiar” los restos de orina de la uretra (Salisbury *et al.*, 1978; Hafez, 2000).

2. ESPERMATOGÉNESIS Y ENDOCRINOLOGÍA DEL TORO

2.1. Espermatozoides

Los espermatozoides son los gametos masculinos que se encuentran formando parte del semen y se caracterizan principalmente por ser células móviles. Son células haploides que transportan la mitad del material genético que finalmente formarán un nuevo individuo. Los espermatozoides maduros se dividen según su estructura anatómica en dos componentes básicos: cabeza y cola o flagelo (**Figura 2**) (Ungerfeld, 2002).

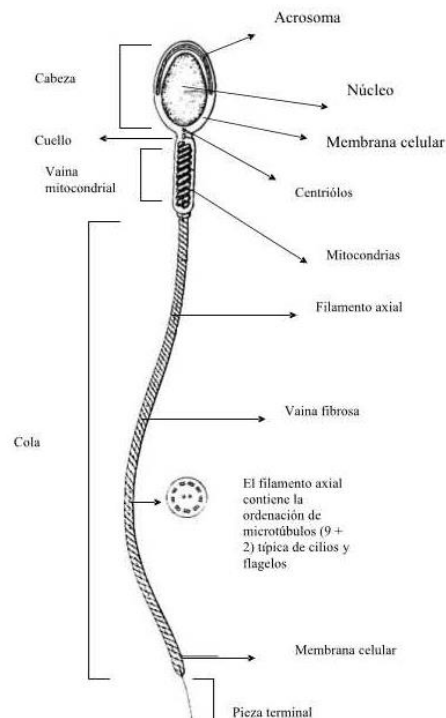


Figura 2. Esquema de un espermatozoide bovino y sus partes anatómicas (Hidalgo, Tamargo Miguel & Díez Monforte, 2005).

La cabeza contiene en su interior un núcleo aplanado oval que está formado por cromatina altamente compactada, y un acrosoma, que se ubica en el extremo anterior de la cabeza a modo de “capucha”. Este último, puede ser definido como un lisosoma o una vesícula de doble pared que se origina a partir del aparato de Golgi. Contiene múltiples enzimas hidrolíticas, de las cuales las más abundantes son hialuronidasas y proacrosinas, que están íntimamente relacionadas con el proceso de fecundación (Graves, 1978; Hafez, 2002; Ungerfeld, 2002).

La cola del espermatozoide se encuentra subdividida en cuatro regiones: cuello y segmentos medio, principal y caudal. A lo largo y central de todo el flagelo se encuentra el axonema, que está formado por nueve pares de microtúbulos radialmente organizados alrededor de dos filamentos centrales. Relacionadas periféricamente a cada par de microtúbulos se hallan las fibras densas. La pieza intermedia contiene mitocondrias ordenadas helicoidalmente en torno al axonema, que tiene la función de ser una rápida fuente de energía. Todas estas estructuras son las responsables de generar el movimiento rápido, progresivo y rectilíneo característico de este tipo de célula (Ungerfeld, 2002).

2.2. Espermatogénesis, espermiación y eyaculación

La espermatogénesis consiste en la suma de todas las transformaciones celulares en el desarrollo de las células germinales; es decir, es el proceso por el cual las espermatogonias sufren cambios hasta convertirse en espermatozoides. Tiene lugar en los túbulos seminíferos y ocurre en tres fases: proliferación, meiosis y espermiogénesis. La primera fase involucra a las espermatogonias, que se ubican en el compartimiento basal del tubo seminífero. En esta fase de proliferación, varias generaciones de espermatogonias son sometidas a divisiones mitóticas, generando una gran cantidad de espermatogonias en diferenciación. La segunda fase se

denomina fase meiótica e implica a los espermatocitos, que dependiendo en la fase de división en que se encuentren, pueden clasificarse como primarios o secundarios. El resultado de la fase de meiosis es la producción de espermátidas, células haploides. En la última fase tiene lugar la conversión de espermátidas en espermatozoides, y en ella no ocurren más divisiones celulares. En cambio, sucede el incremento de tamaño de la célula y la aparición de ciertas estructuras que van a conformar al espermatozoide propiamente dicho (Ungerfeld, 2002; Senger, 2005).

La espermiación se da luego de la espermatogénesis y es el proceso por el cual las células de Sertoli liberan al espermatozoide a la luz del túbulo seminífero. A pesar de que la mayoría de las transformaciones morfológicas ya se han completado para este momento, esa célula no es capaz aún de fecundar un gameto femenino. Dicha capacidad fecundante será adquirida a través de varias etapas que tendrán lugar durante su tránsito por el epidídimo y conducto deferente, almacenamiento, y culminando en el tracto reproductor femenino (capacitación). Todos estos procesos generan que el contenido proteico de la célula aumente conforme el contenido lipídico disminuye, con un alto grado de instauración de los fosfolípidos y bajos niveles de colesterol (Ungerfeld, 2002).

La eyaculación es el pasaje de semen por la uretra peneana. Para que esta pueda llevarse a cabo, el músculo bulbo esponjoso comprime el bulbo peneano, de modo que bombea sangre desde éste hacia el resto del cuerpo esponjoso. A diferencia del cuerpo cavernoso peneano, éste normalmente es drenado por venas dístales y las ondas de presión ayudan a transportar el semen por la uretra (Hafez, 2002). Los espermatozoides que son eyaculados son aquellos que han madurado luego de una etapa de almacenamiento; mientras que aquellos que no llegan a ser eyaculados, se eliminan de forma gradual por excreción en la orina (Graves, 1978; Hafez, 2000).

2.3. Control endócrino

Las principales glándulas implicadas en estos procesos son la pituitaria y los testículos, pero también intervienen las glándulas adrenales y tiroides (Salisbury *et al.*, 1978). El control hormonal de la espermatogénesis está dado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Para el funcionamiento testicular normal se requiere de estimulación hormonal por gonadotropinas adenohipofisarias (LH y FSH), las cuales, a su vez, son controladas por la secreción pulsátil de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) del hipotálamo (Hafez, 2000). Estas gonadotropinas adenohipofisarias son las principales mediadoras del SNC sobre las actividades endócrinas y gametogénicas de las gónadas. La LH es liberada en 3-4 episodios diarios que persisten por aproximadamente 1,5 horas, y tiene una acción indirecta sobre la espermatogénesis a través de la estimulación de la producción de testosterona por las células de Leydig. Por Otro lado, la FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la espermiogenesis. A su vez, la testosterona es necesaria para el mantenimiento de la espermatogénesis y ejerce un mecanismo de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipofisis-testículo (Bloom & Fawcett, 1995; Hafez, 2000; Ungerfeld, 2002).

3. PROCESAMIENTO Y EVALUACIÓN DEL SEMEN BOVINO

3.1. Colección y preservación seminal

El semen es el líquido descargado por el macho durante el coito (Arthur *et al.*, 1991). Básicamente, es una suspensión líquida celular que contiene a los gametos masculinos y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida isoosmolar de dicha suspensión se conoce como plasma seminal y procede de los testículos, epidídimos y las glándulas accesorias. El principal objetivo de la evaluación seminal es garantizar que el semen a utilizar sea fisiológicamente normal para los parámetros establecidos para cada especie, y en base a ello poder tomar decisiones en los porcentajes de dilución (Hafez, 2002; Ungerfeld, 2002).

La extracción de semen es un proceso no invasivo y para fisiológico que permite conservar un elevado número de muestras para su utilización en fresco y/o ser criopreservadas (Holt, 2001). A pesar de la amplia variedad de técnicas existentes para la colección de semen, las tres más utilizadas en la práctica son la vagina artificial, el electroeyaculador y el masaje transrectal. Para que un toro pueda ser autorizado para la colección y el congelamiento de semen, el animal debe estar aprobado mediante un examen físico completo de salud general y reproductiva (Arieta, Fernández & Menchaca, 2014).

Los diluyentes son compuestos o sustancias químicas que se emplean para preservar la viabilidad y fertilidad del semen, a la vez que aumentan el volumen total posibilitando el procesamiento de un número previamente establecido de espermatozoides (Cavestany, 1994). En base a su composición genérica, los diluyentes deben cumplir ciertas funciones como aportar nutrientes como fuente de energía, proteger contra el efecto nocivo del enfriamiento rápido, proporcionar efecto tampón, mantener una presión osmótica y balance de electrolitos adecuados, e inhibir la proliferación bacteriana (Gil *et al.*, 2000). Así mismo, es necesario el agregado de agentes crioprotectores que son sustancias que protegen a la célula del daño cuando es sometida a bajas temperaturas. La principal función de un crioprotector es prevenir la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra y extracelular, a la vez que tiene que ser inocuo para las células (Medeiros, Forell, Oliveira & Rodrigues, 2002; Córdova *et al.*, 2015). Los componentes básicos de un diluyente son agua que actúa como solvente; sustancias disueltas iónicas y no iónicas, para mantener la osmolaridad y tamponar el pH del medio (generalmente citrato de sodio, Tris amino metano o glutamato monosódico); sustancias orgánicas con capacidad de impedir el choque de frío (por lo general yema de huevo o leche); agentes crioprotectores, como glicerina o dimetilsulfóxido (DMSO); azúcares simples, como fuente de energía; aditivos tales como enzimas, que puedan mejorar la fertilidad; antibióticos, para controlar el crecimiento microbiano (Vishwanath & Shannon, 2000).

La criopreservación es un proceso mediante el cual las células o tejidos se conservan a bajas temperaturas (entre -80 y -196°C) con el objetivo de disminuir sus funciones vitales, y de esta manera, poder mantenerlas en condiciones de vida latentes suspendida por tiempo indefinido. En las biotecnologías de la reproducción, se emplea como medio congelante al nitrógeno líquido (N²), el cual tiene una temperatura de ebullición -196°C (Córdova *et al.*, 2015). El proceso de

criopreservación del semen involucra cinco etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación (Watson, 1995).

3.2. Pruebas macroscópicas de evaluación seminal

3.2.1. Volumen

El volumen normal de un eyaculado tiene un amplio rango que varía desde 2 a 12 ml, con un promedio para toros mayores de 2 años de 4 ml, que varía por distintos factores como son la edad, frecuencia de eyaculación, entre otros. Se pueden encontrar situaciones patológicas en las que, por alguna causa, no se observa eyaculado (aspermia), el volumen está reducido (hipospermia) o aumentado (hiperespermia) anormalmente (Ax *et al.*, 2000).

3.2.2. Aspecto

El eyaculado como tal, debe verse como un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento (Ax *et al.*, 2000). En la **Tabla 1** se presenta el aspecto normal de un eyaculado en relación a su concentración espermática y el valor descriptivo que se le otorga.

Tabla 1. Aspecto del eyaculado correlacionado a la concentración espermática con la asignación de un valor descriptivo para cada caso.

Aspecto	Valor descriptivo	Número de spz (spz/mm³) *
Cremoso espeso	Muy bueno	> 750.000
Lechoso	Bueno	400-750.000
Lechoso aguachento	Regular	250-400.000
Traslucido	Pobre	< 250.000

*Valores estimados según el aspecto obtenido

Fuente: Ax *et al.*, 2000.

3.2.3. Olor

El olor es *sui géneris*, característico de cada especie animal. Puede tomar un olor urinoso si se mezcla con orina, o putrefacto, en mayor o menor intensidad, si se mezcla con productos purulentos y/o necróticos (Bonadonna, 1989).

3.2.4. Color

El semen posee una coloración blanco-cremosa con tono marfil y en algunos casos puede verse ligeramente amarillenta debido a la presencia inocua. Su opacidad se halla en función de la concentración espermática (Ax *et al.*, 2000). En ocasiones, se puede observar un color verdoso por la existencia de procesos necrotizantes en alguna parte del tracto reproductor. Puede también estar coloreado de rojo vivo por la presencia de sangre cuando hay heridas recientes en prepucio, glande o uretra, a menudo producidas durante la recolección artificial (Bonadonna, 1989).

3.2.5. Motilidad en masa macroscópica

Es un dato subjetivo, definida como movimientos en ondas y remolinos, que se refiere a la motilidad de la masa como resultado del movimiento conjunto de los espermatozoides de una muestra. Es particularmente evidente en el semen rico en elementos celulares vivos y activos, como es el caso de los rumiantes. Se lo puede evaluar poniéndolo a contraluz; sin embargo, la aparente escasez de actividad masiva no es un elemento suficiente para juzgar que un determinado semen es de calidad inferior (Bonadonna, 1989).

En la siguiente tabla (**Tabla 2**), se describe un sistema de clasificación donde se valora de forma subjetiva en una escala que va de 0 a 5. La puntuación de 5 se corresponde con oleadas o remolinos de movimientos rápidos y vigorosos, y, la de 0, cuando no se observan movimientos en ondas. También se puede clasificar mediante cruces.

Tabla 2. Valoración de la motilidad masal macroscópica de eyaculados bovinos.

Escala		Movimientos en ondas
5 – 4	+++	Movimientos masivos muy marcados y rápidos
3	++	Movimientos en masa aparentes, pero moderados
1 - 2	+	Ondas en movimientos apenas aceptables
0	-	No hay ondas, semen sin movimiento

Fuente: Bonadonna, 1989.

3.2.6. pH

El pH del semen bovino recién eyaculado depende principalmente de las secreciones implicadas. Normalmente se encuentra en el lado ácido de la neutralidad, oscilando en valores de 6,5 a 6,9 y con una media de 6,75 (Derivaux, 1976). El semen de buena calidad suele ser más ácido en comparación con uno de menor calidad. Esto se puede explicar porque, en general, un semen de mala calidad contiene una mayor proporción de líquido procedente de las glándulas uretrales y accesorias aumentando su pH (Salisbury *et al.*, 1978; Ax *et al.*, 2000).

3.2.7. Cuerpos extraños

La muestra debe estar libre de polvo, tierra, pasto, heces, pelo y otros contaminantes. La presencia de alguno de estos es indicadora de una mala técnica de extracción de semen, debiendo desecharse las muestras contaminadas (Ax *et al.*, 2000).

3.3. Pruebas microscópicas de evaluación seminal

3.3.1. Motilidad en masa microscópica:

El movimiento en masa depende de tres factores: concentración, porcentaje de células con movimiento progresivo y velocidad de movimiento de los espermatozoides. Cuando uno de estos tres factores se encuentra disminuido, las ondas rápidas en remolinos esperadas van a ser severamente deprimidas o eliminadas. Por ejemplo, una muestra con un 80% de motilidad individual puede no

tener prácticamente ondas por baja concentración o por baja velocidad de movimiento. Por otro lado, una muestra con una muy buena concentración y un alto porcentaje de movimiento progresivo individual puede producir poco o nada de movimiento de onda si la velocidad de los espermatozoides ha sido disminuida por temperaturas frías o por haber transcurrido un largo intervalo entre la colecta y la evaluación. Consecuentemente, la motilidad masal debe ser interpretada cuidadosamente. La determinación de la motilidad masal se realiza utilizando una gota de semen puro colocada sobre un portaobjeto atemperado y sin cubreobjetos. La observación se realiza bajo un campo luminoso con un aumento de 40X, y se evalúa la presencia de ondas cerca del borde de la gota (Bonadonna, 1989). Se clasifica según el porcentaje de células móviles a través de una escala de motilidad en masa microscópica que se muestra a continuación (**Tabla 3**). Se consideran aceptables para utilizar semen fresco niveles de entre 1 y 3, mientras que, para su congelación, el valor para ser aceptado sería de 3 a 5 (Tribulo *et al.*, 2002).

Tabla 3. Escala de la motilidad en masa microscópica.

Escala		Valor descriptivo	Movimientos en ondas
5 – 4	+++	Muy buena	Movimientos masivos muy marcados y rápidos
3	++	Buena	Movimientos en masa aparentes, pero moderados
1 - 2	+	Regular	Ondas en movimientos apenas aceptables
0	-	Mala	No hay ondas, semen sin movimiento

Fuente: Bonadonna, 1989.

3.3.2. Densidad

Este parámetro permite predecir, de forma subjetiva mediante una escala, la concentración espermática, o sea el número de espermatozoides por mm³ o cm³. La densidad está estrechamente relacionada con el aspecto del semen. Como fue mencionado anteriormente, debe tener un aspecto opaco y relativamente uniforme, lo cual es indicativo de una alta concentración de células espermáticas (Ax *et al.*, 2000). En la **Tabla 4** se describe la correlación existente entre los parámetros de concentración y densidad del semen de bovino.

3.3.3. Motilidad individual:

La estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles en una muestra de semen es uno de los análisis de rutina para evaluar la calidad espermática. La motilidad es un reflejo de la actividad flagelar. Los espermatozoides con actividad flagelar normal son capaces de cruzar la unión útero-tubárica y entrar en el oviducto, mientras que los espermatozoides con función flagelar anormal son incapaces de hacerlo. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles o ausencia de motilidad (astenozoospermia), debería ser automáticamente descartado para su conservación. Por otro lado, si bien la motilidad es una manifestación de viabilidad e integridad celular, no necesariamente garantiza que una célula sea fértil. La integridad

del material genético del espermatozoide también debe tenerse en cuenta para emitir un juicio de fertilidad, dado que espermatozoides con acrosomas dañados, por ejemplo, competir con los normales llegando al ovulo. A pesar de ello, en este caso no se va a lograr la fecundación correctamente generando así problemas de infertilidad. La motilidad puede verse alterada e incluso suprimida cuando existe muerte celular por otras causas, como es el caso de espermatozoides muertos por presencia de bajas concentraciones de algunos productos químicos (Roberts, 1979; Den Daas, 1992; Holt & Van Look, 2004; Graham & Mocé, 2005).

Tabla 4. Correlación entre concentración y densidad espermática.

Criterio de evaluación		Descripción	Número de spz estimados
DD	Densísimo	Se observan los spz superpuestos	$> 1.500.000 \text{ spz/mm}^3$
D	Denso	El campo óptico está lleno de spz y entre ellos no existen espacios	$800 - 1.500.000 \text{ spz/mm}^3$
SD	Semi denso	Campo visual con espacios intermedios entre los spz del tamaño de una cabeza.	$800 - 500 \text{ spz/mm}^3$
R	Ralo	Espacios libres amplios.	$500-200 \text{ spz/mm}^3$
O	Oligospermia	Spz separados por grandes espacios.	$< 200 \text{ spz/mm}^3$
A	Azoospermia	No se observan spz.	Ausencia

Fuente: Ax *et al.*, 2000.

3.3.4. Vigor

El vigor es la velocidad con la que los espermatozoides atraviesan el campo óptico. Este puede ser evaluada conjuntamente con la motilidad individual, y se clasifica bajo la siguiente escala mostrada en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Escala del vigor del movimiento ondulado de los espermatozoides bovinos.

Grado	Nivel de movimiento
5	Movimiento progresivo muy rápido, cel. difícil de seguir visualmente
4	Movimiento progresivo rápido
3	Movimiento progresivo continuo a velocidad lenta
2	Lento movimiento de cola con algo de movimiento progresivo
1	Leve movimiento de cola sin desplazamiento progresivo
0	Sin movimiento

Fuente: Ax *et al.*, 2000.

3.3.5. Concentración

La determinación exacta del número de espermatozoides y el volumen del eyaculado define el porcentaje de dilución (Ax *et al.*, 2000). Este parámetro no solo está influido por la edad, sino que también por factores como el método de colección,

condición corporal, desarrollo sexual, madurez del toro, régimen de alimentación, estado de salud reproductiva, tamaño de los testículos y la época del año. La concentración espermática se puede medir usando una cámara de Neubauer o un espectrofotómetro (Elliot, 1978; Ax *et al.*, 2000).

3.4. Determinación de anomalías espermáticas

Las anomalías espermáticas en el semen de toro representan uno de los factores más importantes que afectan la fertilidad. La morfología de los espermatozoides refleja la salud de los túbulos seminíferos y del epidídimo. Identificar los tipos específicos de anomalías que se pueden encontrar en el espermatozoide y el porcentaje en que éstos se detectan, permite realizar un buen diagnóstico de calidad del eyaculado y efectuar un pronóstico de fertilidad potencial. A continuación, se clasifican las malformaciones espermáticas según diferentes criterios:

- Anomalías primarias, secundarias y terciarias. Esta clasificación se basa en el lugar anatómico de origen de la anomalía. Las malformaciones primarias son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis; las secundarias, se producen dentro del epidídimo; y terciarias son las que se generan *post* eyaculación (Gómez & Migliorisi, 2005).
- Anomalías según la región espermática implicada. Se pueden clasificar en anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la cola (Muiño *et al.*, 2005).
- Alteraciones menores o compensables y mayores o no compensables. Los defectos clasificados como compensables son aquellos en los que el espermatozoide anormal no es capaz de llegar a la vecindad del ovocito y, consecuentemente, no compite con otra célula por la fertilización. Por lo tanto, se podría llegar a compensar con un aumento de la dosis seminal. En cambio, los defectos no compensables son aquellos en los cuales el espermatozoide está perfectamente capacitado para llegar hasta el ovocito y fecundarlo, produciendo así el bloqueo de la zona pelúcida y evitando la polispermia. Sin embargo, luego de ingresar al ovocito es incapaz de continuar el proceso de división del cigoto, lo cual genera un fracaso en la fecundación. En los casos en los que exista esta alteración, es necesario realizar una cuantificación ya que con porcentajes superiores al 20% de patologías no compensables, no existirá diferencia al incrementar la concentración de la dosis inseminante. Esto es porque siempre tendríamos 20% de chances de que un espermatozoide con este tipo de defecto inicie la reacción acrosómica y bloqueo de la polispermia (Gómez & Migliorisi, 2005).

En general se ha aceptado que el semen del toro clasificado como satisfactorio debería contener al menos 70% de espermatozoides morfológicamente normales, con no más del 20% de espermatozoides con anomalías de la cabeza (Menon, Barkema, Wilde, Kastelic & Kastelic, 2011).

3.5. Análisis de calidad seminal *post* descongelado

Con la criopreservación se busca mantener la viabilidad y funcionalidad del espermatozoide. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que, dado lo complejo de la técnica, pueden existir problemas que generen alteraciones de los espermatozoides como son: el choque térmico (temperatura), osmótico (concentración del medio de congelación) y físico (formación de cristales de hielo) (Foote, 2002). Estos, van a derivar en un patrón irregular del movimiento, pérdida de la motilidad, aumento de la permeabilidad de la membrana, disminución del metabolismo, pérdida de componentes intracelulares, y disminución de la producción energética (Watson, 1995). Es por tal razón que es necesario el análisis *post* descongelado, dado que un semen en excelente aptitud para su congelación no garantiza que tras el descongelado esté en iguales condiciones. Con este fin, existen, por ejemplo, métodos computarizados para el análisis de la calidad seminal.

El analizador de semen asistido por computadora (CASA por sus siglas en inglés: Computer Assisted Sperm Analysis) fue desarrollado con el fin de eliminar la subjetividad inherente a la evaluación microscópica seminal (Holt & Van Look, 2004). El sistema CASA es capaz de obtener información sobre parámetros como concentración, motilidad y morfología del semen mediante el procesamiento de imágenes digitales de cada espermatozoide que lo compone. Su funcionamiento se basa en la digitalización de imágenes sucesivas de una suspensión de esperma, normalmente en un lapso de tiempo de un segundo. Detectan los objetos en función de la intensidad de los píxeles en un marco o dispersión de luz. Así mismo, pueden arrojar información respecto a características morfológicas normales y/o anómalas (gotas citoplasmáticas, enrollamiento de colas, integridad de la membrana, estado del acrosoma, entre otros) (Amann & Waberski, 2014). El CASA consta de varias unidades independientes pero que se encuentran acopladas, estas son, un microscopio de contraste de fase conectado a una cámara de video, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor. Posteriormente, la imagen es enviada a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías seriadas de cada campo microscópico seleccionado, normalmente en menos de un segundo. El software es capaz de discriminar a los espermatozoides de otras partículas que pueden aparecer en la imagen de acuerdo a su tamaño, a la vez que analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundos. Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los CASA, y que se encuentran detallados en la **Tabla 6**.

Al final del proceso el sistema proporciona una serie de datos relativos a la distancia, velocidad y tipo de trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual rastreado. Logrando obtener información precisa, objetiva y repetible sobre el porcentaje de células móviles presentes en la muestra, y la calidad media de ese movimiento. Incluso permite clasificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimientos que coexisten en la misma muestra de semen (Holt & Van Look, 2004).

La fiabilidad, exactitud y precisión del análisis CASA bajo diversas condiciones experimentales, dependen en gran medida de la experiencia y formación de los usuarios sobre determinados aspectos como calibración, validación y optimización del

procesamiento de semen antes del análisis (Verstegen, Iguer – Ouada & Onclin, 2002; Kathivaran, Kalatharan, Karthikeya, Rengarajan & Kadirvel 2011).

Tabla 6. Parámetros cinemáticos más comunes proporcionados por el análisis de esperma asistido por ordenador.

Abreviación	Descripción	Definición	Unidad
VAP	Velocidad media de trayectoria	Velocidad promedio del camino suavizado del espermatozoide	µm/sec
VSL	Velocidad en línea recta	Velocidad promedio medida en línea recta desde el principio hasta el final de una pista.	µm/sec
VCL	Velocidad en línea curva	Velocidad promedio medida sobre la trayectoria real de punto a punto seguida por el espermatozoide	µm/sec
LIN	Linealidad	VSL/VCL ratio	%
STR	Rectitud	VSL/VAP ratio	%
WOB	Oscilación	VAP/VCL ratio	%
BCF	Frecuencia de cruce	La trayectoria curvilínea intercepta la trayectoria promedio, y el número de dichas intersecciones se denomina frecuencia de cruce de ritmo	Hz

Fuente: Yeste, Bonet, Rodriguez-Gil & Rivera, 2018.

4. FIPRONIL

4.1. Principales características

El Fipronil es un plaguicida de la familia de los fenilpirazoles, y su fórmula química es $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ como se ilustra en la **Figura 3**. Es ampliamente utilizado en el control de insectos en la agricultura y para la eliminación de pulgas, garrapatas y otros ectoparásitos en medicina veterinaria (Bae & Kwon, 2020). Es efectivo contra insectos resistentes a los organofosforados, piretroides y carbamatos, y puede ser utilizado en hembras preñadas (Errecalde & Mestorino, 2013). Actúa por contacto y por acción en el sistema digestivo luego de que es ingerido por el parásito, siendo efectivo tanto en estadio larvario como en adultos (Tingle, Rother, Dewhurst, Lauer & King, 2003; Baynes, 2009).

Este fármaco fue sintetizado por primera vez en 1987 por la compañía Bayer®, y, a fines de ese mismo año, ya estaba registrada en 63 países para uso no agrícola y en 52 para uso agrícola (Beltran, Montes & Argaiz, 2023). En Uruguay, a mediados de los años 90, se comenzó a utilizar para el control de la garrapata común del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Castro Janer *et al.*, 2012). Desde ese momento hasta la actualidad sus restricciones de uso han ido variando según prohibiciones de usos y/o formulados reguladas por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP). Según la legislación actual uruguaya: “Únicamente podrá autorizarse la comercialización y uso en el país de productos veterinarios formulados en base a

Fipronil, a una concentración no superior a 10% de ingrediente activo, y solo para la aplicación en animales, según indicación terapéutica” (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2014).

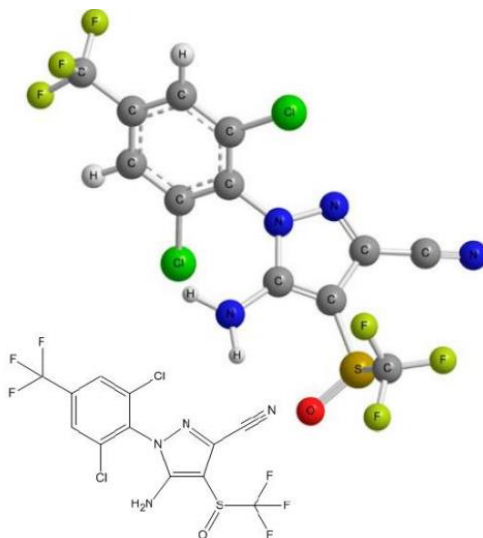


Figura 3. Estructura química del Fipronil, de Jackson, Cornell, Luukinen, Buhl & Stone, 2009.

4.2. Propiedades fisicoquímicas

Es un compuesto de baja a moderada solubilidad en agua, y es altamente lipofílico. El Fipronil como producto puro, es un polvo blanco, cuyo punto de fusión es de 203°C, presenta una baja volatilidad y es estable a temperatura ambiente. Por otra parte, cuando es expuesto a la luz solar directa, sufre una ligera fotólisis (Tingle *et al.*, 2003), degradándose en una amplia variedad de metabolitos, uno de los cuales, el Fipronil Desulfinyl, es considerablemente estable y más tóxico que el compuesto madre (Gunasekara, Truong, Goh, Spurlock & Tjeerdema, 2007). Tiene un POW (coeficiente de reparto octanol-agua o coeficiente de partición) para el compuesto madre y sus metabolitos de 3,5 - 4, lo que puede producir bioacumulación (Food and Agricultural Organization, 2001). Así mismo, se caracteriza por tener una baja a moderada afinidad para los entornos de carbono orgánico como los suelos. Es más denso que el agua y tiene diferentes tiempos de degradación microbiana, dependiendo de la condición del medio ambiente del suelo (aeróbico o anaeróbico). No es estable en presencia de iones metálicos (Tingle *et al.*, 2003).

4.3. Farmacocinética

Este principio activo se absorbe por piel y se distribuye por la epidermis depositándose en las glándulas sebáceas del animal, para luego liberarse de forma gradual con la secreción glandular para recubrir progresivamente la piel y el pelo del animal, obteniendo así un efecto prolongado en el tiempo (Rubio & Boggio, 2009). El Fipronil se puede aplicar sobre la piel en forma de *spray* (aspersión) o como concentrado monodosis *spot-on* o *pour-on*, teniendo como objetivo mantener concentraciones efectivas en la piel para controlar ectoparásitos (Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, 2011; Ankich, 2014).

Fipronil se degrada por reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y fotólisis, dando lugar a 4 metabolitos principales: Fipronil– Sulfona, Fipronil–Sulfuro, Fipronil–Amida, y Fipronil–Desulfinilo. La fotólisis (reacción con la luz UV) da lugar al Fipronil–Desulfinilo, la degradación a Amida ocurre por hidrólisis, la oxidación a Fipronil–Sulfona ocurre en ambientes aerobios y la reducción a Fipronil–Sulfuro se da en sedimentos o suelos anaerobios (Beltrán *et al.*, 2023). Y son las heces a principal vía de eliminación de Fipronil y sus metabolitos (Rose *et al.*, 1999; Mohamed *et al.*, 2004) y en menor proporción por orina (Jackson *et al.*, 2009).

4.4. Farmacodinamia

Actúa a nivel del sistema nervioso central de invertebrados anulando el efecto neuroregulador del GABA. Su mecanismo de acción se basa en interferir en los canales de Cl^- acoplados a los receptores del GABA, actuando, así como un bloqueador no competitivo de los mismos. Esto provoca una menor entrada de Cl^- a la neurona, interrumpiendo la regulación de los impulsos nerviosos. Dado que el GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, la acción antagónica gabaérgica aumenta el impulso nervioso, conduciendo a una excesiva activación neuronal y una muerte del insecto por hiperexcitación (Zaccarelli Magalhães *et al.*, 2018).

El GABA se sintetiza por la acción de una enzima, la Glutamato descarboxilasa a partir de Glutamato. Se conocen dos receptores para el GABA, el GABA_A y el GABA_B. El acople del neurotransmisor al sitio activo del receptor produce la apertura de éste, permitiendo el pasaje de cloro hacia el interior de la célula. El resultado de esta activación depende del potencial de membrana en el cual ocurra. La apertura de canales de cloro tendrá como consecuencia que el potencial de membrana, se acerque al potencial de equilibrio para el Cl^- (O'Donnell, 2010).

El Fipronil actúa mayormente sobre el receptor GABA_A (Mohamed *et al.*, 2004), y se cree que es más selectivo en este receptor a través de la subunidad β_3 en los artrópodos que en los mamíferos, aunque esta selectividad puede ser menos pronunciada con el metabolito Sulfona y con el metabolito Desulfinil, producto de la fotodegradación (Woodward, 2012). El receptor GABA de los invertebrados, difiere en su estructura molecular y los perfiles farmacológicos de los que se encuentran en los vertebrados (Narahashi, Zhao, Ikeda, Nagata & Yeh 2007), siendo altamente específico para los invertebrados, lo que da un gran margen de seguridad para el uso en los vertebrados (Food and Agricultural Organization, 1997; Gunasekara *et al.*, 2007; Baynes, 2009). El Glutamato es considerado como transmisor sináptico de tipo excitatorio en mamíferos y de tipo inhibitorio en artrópodos. En estos últimos, la excitación en las uniones neuromusculares de los parásitos, se transmite por los receptores de Glutamato. La inhibición de la sinapsis central en los artrópodos, se transmite por ambos receptores, Glutamato y GABA, volviéndose ambos, permeables a los iones Cl^- (Narahashi *et al.*, 2007).

4.5. Toxicología

Además del efecto que tienen los antiparasitarios sobre los animales, hay que recordar que se pueden producir efectos adversos y toxicidad en peces y fauna silvestre, así como también en especies domésticas. No se debe sobredosificar y

evitar o prevenir al máximo la ocurrencia de drenaje hacia terrenos, pastos, chacras o estanques, arroyos, etc. (Boggio, 2005). El Fipronil según Organización Mundial de la Salud (OMS), está clasificado como un plaguicida de clase toxicológica II como se demuestra en la **Tabla 7**, moderadamente peligroso y su DL50 oral aguda para las ratas es de 97 mg/kg (Jackson *et al.*, 2009).

Tabla 7. Clasificación Toxicológica y etiquetado de plaguicidas de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Clase toxicológica	Frase de advertencia	DL50 de ratas (mg/kg de Peso Vivo)	
		Oral	Dermal
Ia	Extremadamente peligroso	<5	<50
Ib	Altamente peligroso	5-50	<50-200
II	Moderadamente peligroso	50-2000	200-2000
III	Ligeramente peligroso	>2000	>2000
U	Productos que normalmente no presentan peligro en el uso	5000 o mayor	

Fuente: *World Health Organization*, 2010

A pesar de que es considerado seguro para su uso en animales, existen múltiples reportes que demuestran su toxicidad y la de sus metabolitos sobre animales de experimentación (Dias de Medeiros *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2015; Mazzo *et al.*, 2018; Merkowsky *et al.*, 2016; Ohi *et al.*, 2004; Šefčíková *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2019) y vertebrados de vida salvaje (Gibbons *et al.*, 2015). Existe evidencia que Fipronil produce más toxicidad en insectos que en mamíferos, debido a su acción selectiva, explicado principalmente por su alta afinidad a los receptores GABA (subunidad beta 3) de los insectos. Trabajos recientes indican que este principio activo y sus metabolitos pueden causar toxicidad en hígado, riñón, y otros órganos vitales al desregular la bioenergética mitocondrial por inhibición de la cadena respiratoria, la homeostasis del calcio, oxidación y estrés nitrosativo, así como daño al ADN y proteínas (Gupta & Anadón, 2018). Fipronil es considerado moderadamente tóxico para mamíferos, pudiendo afectar la reproducción, crecimiento y desarrollo, o el comportamiento, incluso la supervivencia. Para organismos acuáticos es altamente tóxico debido a su predisposición a unirse a los sedimentos y su baja solubilidad en agua, y extremadamente tóxico para las abejas (Beltran *et al.*, 2023).

Fipronil no debe ser utilizado en medicina humana debido a que sus metabolitos son de 6 a 10 veces más tóxicos y persistentes que la molécula madre en esta especie, principalmente el metabolito Fipronil-Desulfinil, producto de la fotodegradación (Tingle *et al.*, 2003). Estudios recientes han demostrado el potencial de los pesticidas para inhibir o inducir enzimas metabolizadoras xenobióticas en hepatocitos humanos (Das, Cao, Cherrington, Hodgson & Rose, 2006).

5. HIPÓTESIS

El Fipronil es citotóxico cuando se expone en forma directa a espermatozoides bovinos con un efecto dependiente al tiempo de exposición.

6. OBJETIVOS

Objetivo general: Estudiar el efecto del Fipronil a máxima solubilidad empleando un modelo de citotoxicidad *in vitro* de espermatozoides de bovinos utilizando un sistema de análisis de semen computarizado.

Objetivo específico: Evaluar y comparar el efecto del Fipronil en estado puro sobre la supervivencia y cinética de espermatozoides descongelados de bovino, a dos tiempos de exposición (20 y 40 minutos).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Para este ensayo en primera instancia se procedió a preparar las soluciones de trabajo de Fipronil. El objetivo fue trabajar con la máxima solubilidad del Fipronil, que corresponde a una concentración de 4,35 μM forzando al máximo la exposición de los espermatozoides a la molécula.

Las soluciones stock del estándar sólido de Fipronil (pureza 99%; HPC Standards GmbH, Alemania) fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO; CARLO ERBA Reagents, Alemania) a una concentración de 10 mM, y posteriormente se realizaron diluciones en PBS hasta alcanzar 8,7 μM 1% DMSO.

Se utilizó un ensayo *in vitro* de citotoxicidad espermática (Ferraro *et al.*, 2016) previamente optimizado por el grupo de trabajo perteneciente al Laboratorio de Reproducción Animal “Dr. Alfredo Ferraris di Perna”, Departamento de Ciencias Veterinarias y Agrarias, Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC), Facultad de Veterinaria y el Laboratorio de Moléculas Bioactivas del Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Paysandú.

Al momento de cada ensayo se usaron dos pajuelas de semen congelado comercial convencional de 0,5 ml de un mismo toro de raza angus. Se descongelaron a 37°C por 40 segundos, luego se secaron con papel toalla y se vaciaron en un microtubo Eppendorf® de 1,5 mL para formar un pool. Consecutivamente, se diluyeron en tampón fosfato salino (PBS) hasta una concentración estandarizada de 40×10^6 esp./ml, determinando la concentración con el sistema CASA.

Se realizaron suspensiones semen:compuesto 1:1 de 100 μL y luego se incubaron en una placa de 96 pocillos a 37°C con agitación orbital por 20 y 40 minutos, conjuntamente con un control negativo (1% DMSO), todo por duplicado (A y B).

Todo el proceso se lo efectuó sobre una platina térmica a 37°C para mantener la temperatura controlada a 37°C. Se obtuvo una alícuota (10 μL) de la suspensión incubada en una cámara Makler® (Sefi Medical Instruments, Israel) y se analizó

mediante el sistema CASA (AndroVision®, Minitube, Alemania), equipado con un microscopio Olympus BX41 (Tokio, Japón) y platina térmica a 37°C.

El software clasifica según el patrón del movimiento en diferentes poblaciones de espermatozoides (progresivos, movimiento local y estáticos) de acuerdo a los parámetros que se muestran en la **Tabla 8**. A su vez, a la población progresiva la clasifica en diferentes subpoblaciones de espermatozoides progresivos según su patrón de movimiento (rápidos, lentos, circulares). Al final del proceso, se obtuvo información sobre la motilidad progresiva (% PROG), velocidad media (VAP), velocidad curvilínea (VCL), frecuencia de cruce de trayectoria (BCF), índice de oscilación (WOB), índice de linealidad (LIN), e índice de rectitud (STR). El análisis de cinética se realizó previo al agregado de los medios de tratamiento e incubación, y luego de 20 y 40 minutos de incubación con el compuesto y los controles, grabando 4 secuencias a 60 campos por segundo. Los resultados se analizaron con el procedimiento mixto del SAS® Studio (2023), y se comparó las medias de los efectos significativos a través del test de Tukey. El modelo estadístico incluyó como efectos fijos a los tratamientos (Fipronil-semen, DMSO 1%-semen), el tiempo (20 y 40 minutos) y las interacciones entre ellos.

Tabla 8. Clasificación de población de espermatozoides de toro según su patrón de movimiento basada en los umbrales del perfil de toro del sistema CASA de Minitube.

Grupo		Parámetros	
Inmóvil	ALH < 4	BCF < 4	
Motiles locales	VCL < 40	VSL < 20	DCL < 15
Motilidad progresiva	Radio >10 < 90	Rotación >0,70	
circular			
Progresivos lentos	VCL < 90		
Progresivos rápidos	VCL > 91		

Fuente: Dominika Becherer, 2023

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

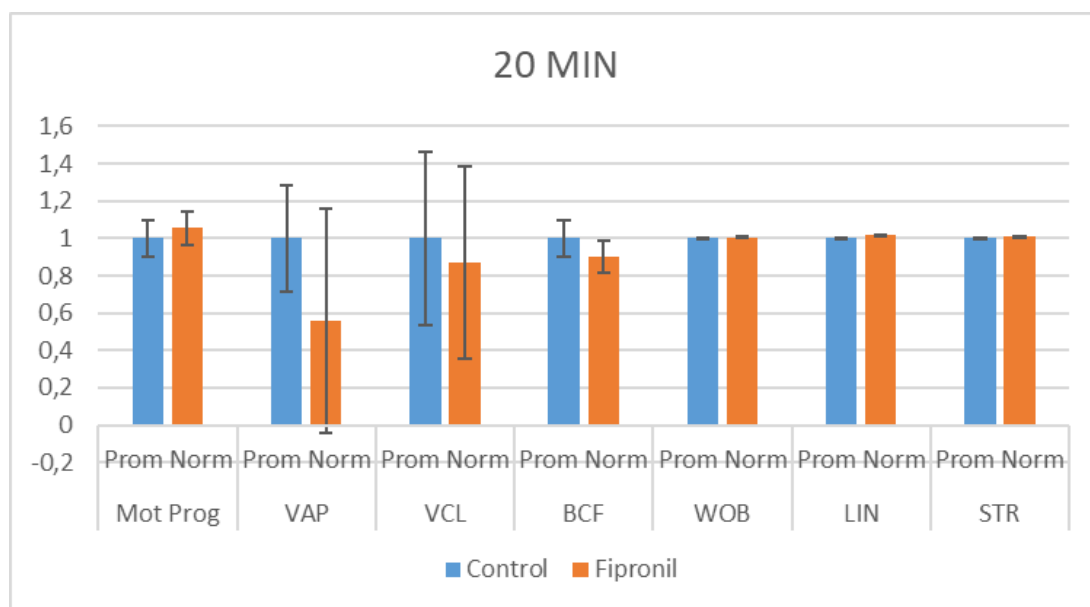
En nuestro trabajo se evaluó *in vitro* la toxicidad directa del Fipronil en estado puro sobre espermatozoides bovinos descongelados, exponiéndolos a la máxima dosis de solubilidad (4,35 μ M), y diferentes tiempos de incubación (20 y 40 minutos).

La utilización de este modelo se justifica porque los ensayos con espermatozoides minimizan ampliamente los aspectos negativos del modelo de cultivo celular tradicional. Teniendo como ventaja que se puede obtener gran cantidad de células frescas fácilmente, de una sola vez y a un bajo costo evitando el sufrimiento animal. Además, son modelos que no requieren esterilidad.

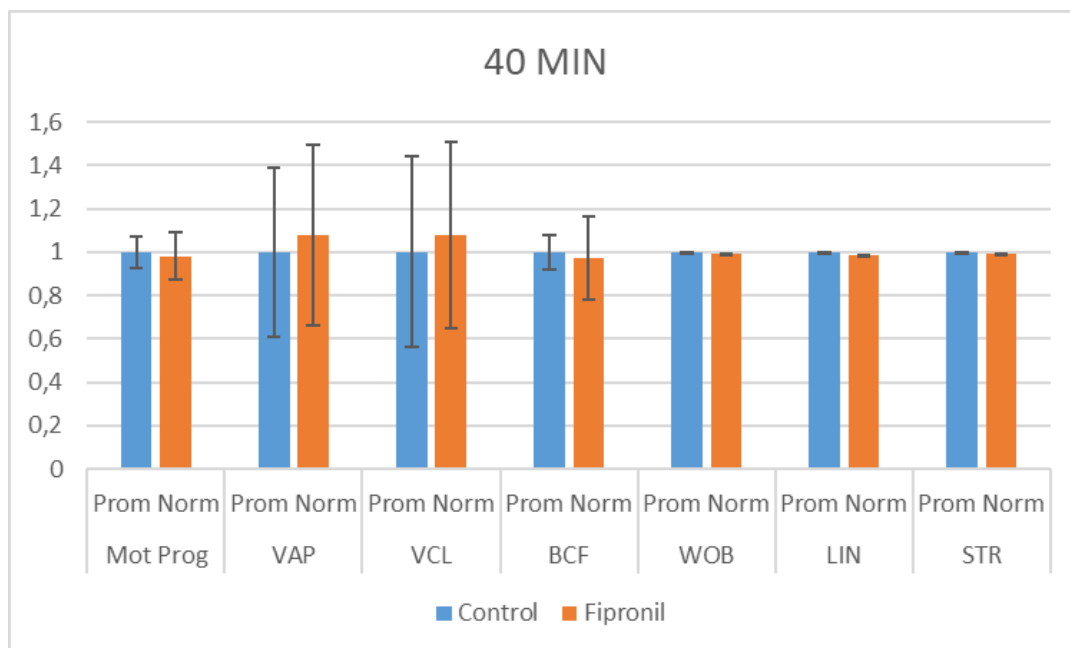
Los resultados se presentan normalizados con la evaluación inicial, tanto para el tratamiento como para el control con 1% DMSO. Como se observa en la **Gráfica 1**, no se registraron diferencias significativas en los parámetros cinemáticos analizados luego de incubar durante 20 minutos. En la **Gráfica 2**, se presentan los resultados de 40 minutos de incubación, observándose el mismo comportamiento.

Evaluación de la calidad seminal previo y *post* tratamiento:

Los parámetros cinemáticos evaluados mediante el sistema CASA, previo y *post* tratamiento, en tiempos de 20 (**Gráfica 1**) y 40 (**Gráfica 2**) minutos fueron: motilidad progresiva (%PROG), velocidad media (VAP), velocidad curvilínea (VCL), frecuencia de cruce de trayectoria (BCF), índice de oscilación (WOB), índice de linealidad (LIN), e índice de rectitud (STR).



Gráfica 1. Evaluación de parámetros cinemáticos de espermatozoides bovinos incubados por 20 minutos (promedios y desvíos estándares normalizados; Mot Prog: motilidad progresiva; VAP: velocidad promedio de la trayectoria espermática; VCL: velocidad curvilínea; BCF: frecuencia de cruce de trayectoria; WOB: índice de oscilación; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud).



Gráfica 2. Evaluación de parámetros cinemáticos de espermatozoides bovinos incubados por 40 minutos (promedios y desvíos estándares normalizados; Mot Prog: motilidad progresiva; VAP: velocidad promedio de la trayectoria espermática; VCL: velocidad curvilínea; BCF: frecuencia de cruce de trayectoria; WOB: índice de oscilación; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud).

La viabilidad espermática ni los diferentes parámetros del movimiento fueron afectados tanto en el control como en el medio con Fipronil en estado puro (a su máxima solubilidad). El control se incubó con DMSO sin fipronil, a efectos de que la única diferencia fuera la presencia del fipronil en el tratamiento. El DMSO es un solvente orgánico utilizado en ensayos biológicos para solubilizar compuestos en estado sólido, y esta evaluado que a una concentración del 1% no produce ningún tipo de efectos adversos en cultivos celulares.

Existen múltiples publicaciones que demuestran la toxicidad del Fipronil sobre animales de experimentación. Bae & Kwon (2020), realizaron un trabajo en ratones macho maduros, a los cuales se administró parenteralmente diferentes concentraciones de Fipronil (0,1, 1, 10, 100 y 300 μM). El tratamiento con Fipronil disminuyó significativamente la motilidad de los espermatozoides extraídos *post mortem* de la cola del epidídimo, los parámetros cinemáticos de movimiento y el nivel de ATP intracelular, mientras que la reacción acrosómica se aceleró. Además, expuestos a fertilización in vitro de ovocitos homólogos, las tasas de escisión y formación de blastocistos disminuyeron significativamente con los espermatozoides de ratones tratados con Fipronil. En conjunto, estos datos sugieren que este fármaco puede suprimir directa e indirectamente varias funciones de los espermatozoides. Por lo tanto, puede afectar negativamente la fertilidad del macho (Bae & Kwon, 2020).

Khan *et al.* (2015) investigaron y caracterizaron la espermiotoxicidad inducida por Fipronil en ratas macho, a las cuales se les administró Fipronil por vía oral (2,5, 5,0 y 10 mg/kg/día) durante 4 semanas. Se recogieron espermatozoides de la cola del

epidídimo y se procesaron para su evaluación histopatológica. El tratamiento redujo significativamente la densidad, la motilidad, la viabilidad y el porcentaje de acrosoma intacto de los espermatozoides junto a un aumento de anomalías espermáticas. La exposición a este compuesto provocó una generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), peroxidación lipídica y alteración en el potencial de la membrana mitocondrial, que condujo a la apoptosis de los espermatozoides de manera dependiente a la dosis. Dosis altas de Fipronil (5 y 10 mg/kg) también redujeron notablemente la integridad del ADN de los espermatozoides. Estos datos sugieren que Fipronil causa toxicidad reproductiva en el macho a través del daño en el ADN inducido por el estrés oxidativo y apoptosis de los espermatozoides (Khan *et al.*, 2015).

En una revisión bibliográfica reciente realizada por Beltrán *et al.*, (2023), concluyeron que si bien la toxicidad selectiva del Fipronil se debe a su mayor potencia para unirse a los receptores GABA de los invertebrados comparada con el de los vertebrados (mamíferos y aves), en el ambiente dicha selectividad se pierde porque los productos de degradación tienden a ser igual o más tóxicos que la propia molécula del Fipronil. Por ejemplo, Fipronil-Sulfona es 3,3 veces más tóxico para peces y 6,6 más tóxico para invertebrados acuáticos. Además, dichos subproductos tienen un coeficiente de adsorción al carbono orgánico (K_{oc}) mayor que la del propio Fipronil, por lo que se tienden a acumular en el sedimento a concentraciones superiores que el propio Fipronil, e incluso cuando éste ya es indetectable. Por ejemplo, en suelos, el principal metabolito es el Fipronil-Sulfuro, mientras que en el agua es el Fipronil-Desulfinito (Beltrán *et al.*, 2023). Es importante evaluar las posibles vías de contacto del fipronil y sus metabolitos, y como éstas moléculas afectan la fertilidad.

Das *et al.* (2006), llevaron a cabo un estudio en el cual examinaron el potencial del Fipronil para inducir importantes enzimas metabolizadoras xenobióticas en hepatocitos humanos y caracterizaron los efectos citotóxicos del mismo. Se expusieron hepatocitos humanos a dosis de Fipronil que oscilaron entre 0,1 y 25 M, y se evaluaron los efectos citotóxicos de este fármaco y su metabolito Fipronil-Sulfona, obteniendo como resultado un aumento dependiente de la dosis en la expresión del ARNm de CYP1A1 (de 3,5 a aproximadamente 55 veces), y afectando a las células HepG2, constatando la sensibilidad de los hepatocitos humanos a estos. Además, Fipronil-Sulfona indujo efectos citotóxicos mayores que el propio Fipronil en dosis más bajas (Das *et al.*, 2006).

Otro reporte brinda información de toxicidad directa de dos neonicotinoides imidacloprid y clotianidina, además del insecticida Fipronil en vertebrados de vida silvestre, demostrando toxicidad también en la descendencia de los mismos (Gibbons *et al.*, 2015). Estos estudios detallan efectos de los pesticidas a una exposición por vía oral y no dérmica como es habitual tratar a los bovinos en los programas de control de garrapata. Estos son ejemplos de la intoxicación por Fipronil, el cual es capaz de reducir el crecimiento, el desarrollo y la reproducción de los vertebrados. Las alteraciones sobre la reproducción se presentan de forma variada entre los mamíferos, entre ellos la reducción de la producción de espermatozoides, efectos adversos en el proceso de fecundación, reducción de la tasa de preñez, tasas más altas de muerte embrionaria, muerte fetal, parto prematuro, y la reducción del peso de la descendencia.

A pesar de estos reportes, la información disponible actualmente sobre los efectos del Fipronil en la fertilidad potencial de toros es escasa. En Uruguay, existe un estudio publicado de su efecto sobre la calidad espermática en toros tratados tópicamente con Fipronil (Acevedo, Artía & Lagreca, 2015), en el cual, a la dosis y vía de aplicación recomendada por el fabricante (10mg/kg), el trabajo no detectó alteraciones espermáticas, ni en otros aspectos reproductivos de los individuos tratados. Dicho estudio se originó a raíz de un reporte de un caso clínico ocurrido en el departamento de Salto, donde se colectaba semen a toros Polled Hereford para congelar cada 20-25 días, y tras tres aplicaciones pour-on de Fipronil cada 30 días se obtuvieron resultados de semen apto en las dos primeras instancias, y semen no apto en las tres instancias siguientes a las aplicaciones. Esta observación empírica de campo puede estar explicada por una posible sobredosificación determinada por la frecuencia de 30 días, no se respetando los intervalos de aplicación entre tratamientos recomendado por los laboratorios.

En casos de sobredosificación no se conoce detalladamente los parámetros farmacocinéticos del fármaco utilizado, como en el caso del relato mencionado anteriormente, por una posible exposición crónica al fármaco. A diferencia con esta tesis, se caracteriza por ser un modelo reduccionista como la mayoría de los ensayos, y no es posible evaluar la sobredosificación. Puede también ocurrir que el Fipronil no sea citotóxico frente a espermatozoides *per se*, sin embargo, puede haber afectado la espermatogénesis y por ende la calidad espermática en etapas de la espermatogénesis o en su proceso de maduración en epidídimo. Nuestro modelo no apunta a comprobar si Fipronil afecta la espermatogénesis, ya que trabaja directamente sobre los espermatozoides.

Cabe destacar que no encontramos estudios publicados que se centren en el efecto de residuos trazas en semen de este fármaco y su daño a los espermatozoides y fertilidad de bovinos machos. La bibliografía también es escasa en estudios de citotoxicidad directa de Fipronil sobre espermatozoides aislados.

En el presente trabajo no se detectaron diferencias significativas sobre la supervivencia y calidad espermática a través del uso de un modelo de citotoxicidad *in vitro* en espermatozoides de bovinos descongelados. Sería relevante evaluar el efecto de espermatozoides expuestos a Fipronil utilizados en fertilización *in vitro*.

Otra propuesta a realizarse en el Laboratorio de Reproducción Animal “Dr. Alfredo Ferraris Di Perna” es evaluar si el propio Fipronil no es tóxico, pero si pueden serlo sus metabolitos generados *in vivo* o *in vitro*. Las dos alternativas a plantearse son: comprar los principales metabolitos descritos, y evaluarlos en nuestro modelo, lo que sería de muy alto costo, o realizar una simulación *in vitro* de una posible metabolización, obteniendo lisado de hepatocitos bovino, e incubar el Fipronil con dicho preparado por un determinado tiempo, esperando obtener los metabolitos *in vitro*, que se generan naturalmente *in vivo*, ya que estarían presentes las enzimas hepáticas citosólicas y microsomales.

9. CONCLUSIONES

La calidad biológica y cinética espermática del semen descongelado de toro no se vio afectada por el tratamiento con Fipronil en estado puro a la dosis de máxima solubilidad de 4,35 μM en los tiempos evaluados de 20 y 40 minutos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, G., Artía, J., & Lagreca, L. (2015). *Estudio del efecto del fipronil sobre la calidad espermática en Toros Polled Hereford* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo.
- Amann, R.P., & Wabers, k D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81, 5-17.
- Ankich A. (2014). *Guía V 2014-2015: Vademécum de especialidades veterinarias: Grandes y pequeños animales*. Montevideo: SINERGIA Comunicaciones Integrales.
- Arieta, R.J., Fernández, J., & Menchaca, J. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 15(5), 1-8. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63633881001>
- Arthur, G.H., Noakes, D.E., & Pearson, H. (1991). *Reproducción y obstetricia en veterinaria (Teriogenología)*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.
- Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority. (2011). *Friponil. Preliminary review findings report* (Vol. 1). Kingston: Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority.
- Ax, R.L., Dally, M.R., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., ... Bellin, M.E. (2000). Evaluación del semen. En E.S. Hafez, & B. Hafez, *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7ª ed., pp. 375-386). Mexico: McGraw-Hill Interamericana.
- Bae, J. W., & Kwon, W. S. (2020). Investigating the effects of fipronil on male fertility: Insight into the mechanism of capacitation. *Reproductive Toxicology*, 94, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.04.002>
- Baynes, R.E. (2009). Ectoparasiticides. En J.E. Riviere & M.G. Papich (Eds.), *Veterinary Pharmacology & Therapeutics* (9ª ed., pp. 1181- 1202) Iowa: Wiley-Blackwell,
- Beltran, D. G., Montes, J. E. P., & Argai, D. V. (2023). Impacto ecológico del insecticida fipronil: valoración de riesgos en humanos. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 70(1), 65-84.
- Bloom, W., & Fawcett, W. (1995). *Tratado de Histología* (12ª ed.) Madrid: Interamericana.
- Boggio Devincenzi, J.C. (2007). *Evaluación de la aptitud reproductiva potencial y funcional del toro: Capacidad de servicio*. Valdivia: Universidad Austral de Chile

- Boggio, J. (2005). Introducción a los Antiparasitarios. En M.R. Rubio & J.C. Boggio (Eds.), *Farmacología Veterinaria* (pp. 525-528). Córdoba: Editorial de la Universidad Católica de Córdoba,
- Bonadonna, T. (1989). *Reproducción animal e inseminación artificial* (2ª ed., 2 Vol.) Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Castro Janer, E., Sato Schumaker, T.T., Marcondes Klafke, G., Rifran, L., González, P., Niell, C., ... Miller, R.J. (2012). *Garrapata: Resistencia a fipronil e ivermectina en rodeos vacunos de Uruguay y Brasil*. Montevideo: INIA.
- Cavestany, D. (1994). *Procesamiento y congelación de semen de toro*. Montevideo: Santa Catalina.
- Córdova, A., Guerra, J.E., Villa, A., Olivares, J., Cansino, G., Juárez, M., & Pérez, J.F. (2015). Embryo freezing cattle. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9(2), 22-40.
- Das, P. C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., & Rose, R. L. (2006). Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 164(3), 200-214.
- Den Daas, J.H. (1992) Laboratory assessment of semen characteristics. *Animal Reproduction Science*, 28, 87-94
- Derivaux, J. (1976). *Reproducción de los animales domésticos* (2ª ed.). Zaragoza: Acribia.
- Dias de Medeiros, H. C., Constantin, J., Ishii-Iwamoto, E. L., & Mingatto, F. E. (2015). Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. *Toxicology Letters*, 236(1), 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.04.016>
- Errecalde, J., & Mestorino, N. (2013). Terapéutica de las ectoparasitosis. En C. Fiel & A. Nari (Coord.), *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control* (pp. 605-638). Buenos Aires: Hemisferio Sur. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Nora-Mestorino/publication/281653080_TERAPEUTICA_DE_LAS_ECTOPARASITOSIS/links/55f36e7408ae1d9803949c69/TERAPEUTICA-DE-LAS-ECTOPARASITOSIS.pdf
- Ferraro, F., Merlino, A., dell' Oca, N., Gil, J., Tort, J. F., Gonzalez, M., & Corvo, I. (2016). Identification of chalcones as *Fasciola hepatica* cathepsin L inhibitors using a comprehensive experimental and computational approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), e0004834
- Food and Agricultural Organization. (1997). Fipronil. Recuperado de <https://www.fao.org/3/W8141E/w8141e0s.htm#4.15>

- Food and Agricultural Organization. (2001). *Pesticide residues in food – 2001. Report of the joint meeting of the FAO panel of experts on pesticides residues in food and the environment and the WHO core assessment group on pesticide Residues*. Roma: FAO.
- Foot, R.H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*, 80, 1-10.
- Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 103-118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Gil, J., Januskauskas, A., Håård, M., Håård, M. G. M., Johannisson, A., Söderquist, L., & Rodríguez-Mártinez, H. (2000). Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus® and Triladyl®. *Reproduction in Domestic Animals*, 35(2), 69-77.
- Gómez, M. V., & Migliorisi, A. L. (2005). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. Recuperado de https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_toros/49-ProtocoloEvalSemen.pdf
- Graham, J. K., & Mocé, E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, 64(3), 492-504.
- Graves, C.N. (1978). El semen y sus componentes. En G.W. Salisbury, N.L. VanDemark & J.R. Lodge, *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en bóvidos* (2ª ed., pp.258-298). Zaragoza: Acribia.
- Gunasekara, A.S., Truong, T., Goh, K.S., Spurlock, F., & Tjeerdema, R.S. (2007). Environmental fate and toxicology of Fipronil. *Journal of Pesticide Science*, 32(3), 189-199.
- Gupta, R.C., & Anadón, A. (2018). Fipronil. En R. C. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology* (3ª ed., pp. 533-538). Amsterdam: Academic Press.
- Hafez, E. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial* (7ª ed.). México: Mc. GrawHill.
- Hafez, E.S. (2000) Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En B. Hafez, & E.S. Hafez, *Reproducción e inseminación artificial en animales* (7ª ed., pp.441-452). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hidalgo Ordoñez, C.O., Tamargo Miguel, C., & Díez Monforte, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Boletín informativo del SERIDA*, (2), 39-43.
- Holt, W. (2001). Germoplasm cryopreservation in elephants and wild ungulates. En P. Watson, & W.V. Holt (Eds.), *Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?* (pp. 319-348). Londres: Taylor and Francis.

- Holt, W. V., & Van Look, K. J. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, 127(5), 527-535.
- Jackson, D., Cornell, C.B., Luukinen, B., Buhl, K., & Stone, D. (2009). Fipronil technical fact sheet, National Pesticide Information Center. Recuperado de <http://npic.orst.edu/factsheets/fiptech.pdf>
- Kathivaran, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computeraided system-a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 165-172.
- Khan, S., Jan, M. H., Kumar, D., & Telang, A. G. (2015). Fipronil induced spermotoxicity is associated with oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 124, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.03.010>
- Mazzo, M., Balieira, K. V. B., Bizerra, P. F. V., & Mingatto, F. E. (2018). Fipronil-induced decrease in the epididymal sperm count: Oxidative effect and protection by vitamin E. *Animal Reproduction*, 15(4), 1223-1230. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2017-0040>
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327-344.
- Menon, A. G., Barkema, H. W., Wilde, R., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2011). Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(4), 241-247.
- Merkowsky, K., Sethi, R. S., Gill, J. P. S., & Singh, B. (2016). Fipronil induces lung inflammation in vivo and cell death in vitro. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12995-016-0102-0>
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2012, agosto 23). Resolución MGAP N° 531/012: Regulación de las condiciones de registro, venta y uso de insecticidas formulados en base a fipronil. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/resoluciones-mgap/531-2012>
- Miraballes, C., Riet-Correa, F., Fuellis, C., & Araoz, V. (2018). Control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y la tristeza parasitaria. *Revista INIA*, (58), 13-17.
- Mohamed, F., Senarathna, L., Percy, A., Abeyewardene, M., Eaglesham, G., Cheng, R., ...Eddleston, M. (2004). Acute Human Self-Poisoning with the N-Phenylpyrazole Insecticide Fipronil—a GABAA-Gated Chloride Channel Blocker. *Clinical Toxicology*, 42(7), 955- 963.

- Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J. L., López, M., Fernández, A. I., & Peña, A. I. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *Información Técnica Económica Agraria*, 101(3), 175-191.
- Narahashi, T., Zhao, X., Ikeda, T., Nagata, K., & Yeh, J.Z. (2007). Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 26(4), 361-366.
- O'Donnell, P. (2010). Génesis y transmisión del impulso nervioso. En M.A. Dvorkin, D.P. Cardinali, & R. Iermoli (Eds.), *Best & Taylor: Bases Fisiológicas de la práctica médica*. (14^a Ed., pp. 851-872). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Ohi, M., Dalsenter, P. R., Andrade, A. J. M., & Nascimento, A. J. (2004). Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicology Letters*, 146(2), 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.08.008>
- Roberts, S.J. (1979). *Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.
- Rose, R.L., Hodgson, E., & Roe, R.M. (1999). Pesticides. En H. Marquardt, S.G. Schäfer, R.O. McClellan, & F. Welsch (Eds.), *Toxicology* (pp. 663-698). San Diego: Academic Press.
- Rubio, M. R., & Boggio, J. C. (2009). *Farmacología Veterinaria* (2^a ed.). Córdoba: EDUC.
- Salisbury, G.W., VanDemark, N.L., & Lodge J.R. (1978). *Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos* (2^a ed.) Zaragoza: Acribia.
- Šefčíková, Z., Babel'ová, J., Čikoš, Š., Kovaříková, V., Burkuš, J., Špírková, A., ... Fabian, D. (2018). Fipronil causes toxicity in mouse preimplantation embryos. *Toxicology*, 410, 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.008>
- Senger, P.L. (2005). Falta el título del capítulo. En *Pathways to Pregnancy and Parturition* (3^a ed). Washington: Current Conceptions.
- Tingle, C.C.D., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S., & King, W.J. (2003). Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 176, 1-66.
- Tribulo, H.E., Alonso, N., Bó, G.A., Brogliatti, G.M., Caccia, M., Carcedo, J., & Tribulo, R. (2002). *Actualización sobre fisiología reproductiva y evaluación de la capacidad reproductiva del toro*. Cordoba: Mariana Caccia.
- Ungerfeld, R. (2002). *Reproducción en los animales domésticos* (Vol. 1). Montevideo: Melibea.

- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-179.
- Vishwanath, R., y Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animals Reproduction Science*, 62, 23-53
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891.
- Woodward, K.N. (2012). Veterinary Pesticides. En T.C. Marrs (Ed.), *Mammalian toxicology of insecticides* (pp. 348-426). Cambridge: Royal Society of Chemistry Publishing.
- World Health Organization. (2010). *The WHO Recommended Classification of pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Yeste, M., Bonet, S., Rodriguez-Gil, J., & Rivera, M. (2018). Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 789-798.
- Zaccarelli Magalhães, J., Meira Sandini, T., Sayuri Berto Udo, M., Rinaldi Fukushima, A., T. y de Soza Spinoso, H. (2018). Fipronil: uses, pharmacological and toxicological features. *Revinter*, 11(1), 67-83.
- Zhou, W., Niu, Y. J., Nie, Z. W., Kim, Y. H., Shin, K. T., Guo, J., & Cui, X. S. (2019). Fipronil induces apoptosis and cell cycle arrest in porcine oocytes during in vitro maturation. *Apoptosis*, 24(9-10), 718-729.