

¿Es posible predecir la fertilidad en los toros?

Ninoska Madrid-Bury, MV, MSc, DMV

*Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia.
Maracaibo-Venezuela ~ ninoskamdrid@yahoo.es*

Uno de los principales problemas en la producción del semen bovino radica en el conocimiento de la fertilidad o capacidad fecundante de cada toro. De una cuidadosa valoración de la fertilidad, dependerá la utilización futura del material seminal y el grado de aprovechamiento de los eyaculados obtenidos durante su vida reproductiva, es decir, las dosis producidas por eyaculado en función del número de espermatozoides viables.

Cuando se realiza un espermograma del semen fresco, se evalúa en forma rutinaria la concentración, motilidad y morfología; una vez congelado, se determina la concentración y la motilidad. La motilidad, es el parámetro más utilizado para valorar la viabilidad de una muestra seminal. Sin embargo, ni el espermograma ni la evaluación que se hace de rutina al semen descongelado en los centros de toros o de inseminación artificial han mostrado ser suficientes para determinar el nivel potencial de fertilidad de una muestra de semen.

En las últimas décadas se han diseñado una serie de técnicas *in vitro* que buscan predecir en forma confiable la fertilidad de los toros utilizados en IA, pero los inconsistentes resultados han mostrado que lo máximo logrado es una estimación de la fertilidad. El hecho que aún no haya sido posible diseñar un método de valoración *in vitro* de las muestras de semen utilizadas se atribuye a que la fertilidad del macho es una característica muy compleja y de naturaleza multifactorial. Es imprescindible que los espermatozoides congelados y descongelados conserven la motilidad, la integridad de sus membranas y su habilidad para capacitarse y desarrollar la reacción acrosómica para que resulten aptos para unirse y penetrar la zona pelúcida, alcanzar el citoplasma del ovocito y formar el pronúcleo masculino, y ello no siempre es fácil de lograr en todos los casos.

Este trabajo presenta y describe algunos de los métodos más utilizados *in vitro* para determinar la capacidad fecundante de los espermatozoides y su relación con la fertilidad *in vivo* del semen congelado de toros.

PRUEBAS DE RUTINA DE VALORACIÓN DEL SEMEN

Motilidad. La motilidad progresiva de los espermatozoides ha sido utilizada ampliamente para predecir la fertilidad de una muestra de semen; sin embargo, los resultados obtenidos en relación con la fertilidad son contradictorios. Se han señalado correlaciones entre motilidad y fertilidad a campo de los machos, que van desde $r=0,15$ hasta $r=0,83$, sin embargo, estos hallazgos no siempre han podido ser corroborados. La evaluación subjetiva con microscopio de contraste de fases es la práctica más común para determinar la motilidad.

En las últimas décadas, la utilización de los equipos CASA (Computer Assisted Sperm Analyser) es una práctica que cada vez se hace más habitual para evaluar en forma objetiva la motilidad espermática. Se ha reportado la relación entre ciertos patrones del movimiento espermático, especialmente movimiento lineal, con la fertilidad *in vivo*. Sin embargo, es importante resaltar que al determinar la motilidad, no se toma en consideración, la habilidad de las células espermáticas para desarrollar ciertos procesos importantes para la fertilización *in vivo*, como son la capacitación, la reacción del acrosoma y la fertilización.

Concentración Espermática. La fertilidad de una muestra de semen dependerá del número de espermatozoides con atributos normales que posea. La fertilidad de los machos bovinos describe una curva de dosis-respuesta en relación al número total de espermatozoides normales inseminados y ese comportamiento es individual para cada toro. Al inicio, la curva muestra un desplazamiento casi vertical, para luego llegar a una meseta, conocida como fertilidad individual máxima. Eso significa, que si se aumenta el número de espermatozoides por dosis por encima del número presente al inicio de la meseta de la curva de fertilidad de un determinado toro, no necesariamente se incrementará en forma significativa la fertilidad de ese animal.

Cuando se realiza la evaluación de rutina del semen descongelado, se considera aceptable para inseminar, una motilidad espermática entre 40 y 50%. Sin embargo, esta motilidad no es un reflejo del número mínimo de espermatozoides necesarios para que el toro tenga una fertilidad aceptable, en especial, si se tiene en consideración que con el proceso de la congelación más del 30% de las células espermáticas sufrirán lesiones irreversibles.

Morfología. Con esta prueba se valora la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y se determina su relación con la fertilidad *in vivo* de los toros. Es utilizada para eliminar toros con pobre calidad seminal y refleja la funcionalidad de los testículos, epidídimos y de las glándulas accesorias. Se han mostrado correlaciones negativas entre los espermatozoides anormales con la viabilidad y con la fertilidad, sin embargo, su utilidad está limitada cuando se evalúan toros en centros de IA que poseen alta fertilidad, ya que las muestras de semen tienen aceptables porcentajes de espermatozoides normales. Generalmente, la morfología no se correlaciona con la fertilidad del toro, a no ser que exista un alto porcentaje de espermatozoides con formas anormales en la muestra.

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS DE FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA

En las últimas décadas, al espermiograma convencional se le han adicionado otras pruebas *in vitro* que valoran la funcionalidad de la célula espermática. Con esas pruebas se trata de determinar la mayor cantidad de atributos de los espermatozoides que son relevantes para la fertilización y para el desarrollo embrionario. La valoración de varios de estos parámetros y su estudio en conjunto, podría conducir a una mejor interpretación de la capacidad fecundante de los espermatozoides, ya que como se ha indicado, la fertilización es un proceso en el que intervienen un gran número de factores o atributos y la valoración de uno solo de ellos, no es suficiente para determinar la fertilidad de una muestra de semen.

Integridad de la Membrana Plasmática. Este test se realiza bajo la presunción de que solo los espermatozoides viables mantienen sus membranas intactas, siendo capaces de interactuar con el oviducto y el ovocito para transportarse, capacitarse y fertilizar. Por otro lado, esta prueba provee información acerca del grado de preservación del semen después de haber sido congelado y descongelado.

La integridad de la membrana se puede determinar a través del test de endósmosis (HOS-T), el cual comprueba la capacidad de la membrana plasmática de la célula espermática de hincharse sin romperse, cuando es expuesta a soluciones salinas hipotónicas. También es posible valorar la integridad de la membrana, a través de tinciones fluorescentes utilizadas solas o en combinación con otros fluorocromos específicos para el ADN; sin embargo, es contradictorio el valor del examen de la integridad de la membrana plasmática para determinar la fertilidad de los toros. Se han señalado correlaciones con la fertilidad *in vitro* e *in vivo* de los machos, aunque cuando las evaluaciones se hicieron mediante fluocitometría o fluorescencia, no se observaron correlaciones con la fertilidad *in vivo*.

Reacción del Acrosoma. La reacción del acrosoma es inducida por la zona pelúcida en el momento en que el espermatozoide entra en contacto con el ovocito. Puede ser inducida *in vitro*, a través de la exposición de los espermatozoides a sustancias como los glicosaminoglicanos (GAGs), de las cuales el más potente es la heparina. Otros GAGs importantes serían el ionóforo de calcio A23187 o el condroitin sulfato.

La habilidad de los espermatozoides de bovino para capacitarse en respuesta a los GAGs y de realizar a continuación la reacción del acrosoma ha sido relacionada con la fertilidad. También se ha indicado, que la inducción de la reacción acrosómica con el ionóforo de calcio A23187 estuvo correlacionada con la fertilidad *in vivo* de los toros, medida por la tasa de no retorno. Por otro lado, se ha señalado que es posible jerarquizar la fertilidad relativa de los toros lecheros, a través del test de la reacción acrosómica en espermatozoides incubados en condroitin sulfato.

Fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario (FIV). La fecundación *in vitro* (FIV) ha sido utilizada como un método complementario para investigar la fertilidad de los toros en condiciones controladas *in vitro*. La importancia de la FIV estaría basada en el hecho de que se han señalado correlaciones positivas entre la fertilidad *in vivo* de los toros con la penetración de ovocitos, la división de embriones y con la formación de blastocistos *in vitro*; sin embargo, en algunos casos no se han confirmado.

La prueba de la penetración *in vitro* refleja varias características del espermatozoide como viabilidad, motilidad, morfología, capacitación y la reacción del acrosoma, valorando la capacidad de los espermatozoides para penetrar y fertilizar ovocitos *in vitro*. En toros se han señalado correlaciones entre la penetración de ovocitos *in vitro* y la fertilidad a campo determinada por la tasa de no retorno.

De igual manera, se han indicado correlaciones positivas significativas entre la división de embriones y la tasa de no retorno, así como entre la división de embriones y los blastocistos obtenidos *in vitro*. Las correlaciones entre el no retorno y los blastocistos producidos *in vitro* son bajas o no se presentan, posiblemente debido a que la formación de blastocistos es más dependiente de las condiciones del cultivo en las que se encuentre el embrión.

Integridad de la cromatina espermática. Los daños en el ADN pueden tener un impacto negativo en el desarrollo embrionario y en la vida futura de la cría. Los daños en la cromatina de los espermatozoides puede no ser observada cuando se valoran las características seminales *in vitro*, lo que significa, que una población de espermatozoides puede parecer normal en el laboratorio y sin embargo, su cromatina puede estar dañada. Se han señalado correlaciones entre la estructura de la cromatina espermática determinada por fluocitometría y la fertilidad de los toros.

Existen varios métodos para determinar el grado de condensación y de estabilidad de la cromatina del espermatozoide. La condensación puede ser evaluada con tintaciones de toluidina o azul de anilina y mediante marcadores fluorescentes (naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) utilizando el microscopio de fluorescencia ó mediante fluocitometría. La estabilidad puede ser evaluada a través del tratamiento de los espermatozoides con diferentes quelatos como el ácido etilén-diamino tetraacético (EDTA), con agentes reductores de puentes disulfuro como el ditiotreitól (DTT) o con detergentes aniónicos como el dodecil sulfato sódico, el cual rompe las uniones no covalentes.

Indicadores moleculares de fertilidad. Una gran variedad de proteínas que han sido propuestas como indicadores de la fertilidad en los machos pero al igual que los ensayos para determinar los atributos de los espermatozoides, no es muy probable que los ensayos moleculares, realizados en forma individual, puedan detectar sub-fertilidad en todas las muestras de semen. No obstante, el análisis múltiple de indicadores moleculares podría ser de más valor.

Informaciones recientes han sugerido que las proteínas del plasma seminal tienen algún efecto sobre la fertilidad. El plasma seminal de los toros de alta fertilidad mejoró en forma marginal la tasa de penetración *in vitro* de los espermatozoides de los toros de baja fertilidad, mientras que, a la inversa, el plasma seminal de los toros de baja fertilidad provocó un descenso en la tasa de penetración de los espermatozoides de los toros con alta fertilidad. Otras investigaciones señalan una alta correlación ($r=0,89$) entre la presencia de algunas proteínas en el plasma seminal y la fertilidad *in vivo* de los toros.

Las proteínas que se unen a la heparina son ejemplos de proteínas de las glándulas accesorias que pueden influenciar la fertilidad. En la superficie de los espermatozoides eyaculados, las proteínas que se unen a la heparina son abundantes, sin embargo, estas proteínas son escasas en la membrana plasmática de los espermatozoi-

des epididímales. La cantidad de Antígeno Asociado a la Fertilización (FAA) en el espermatozoide está asociada con la fertilidad. Al inseminar vacas y novillas con espermatozoides positivos y negativos a FAA, la fertilidad fue alrededor del 15% superior en vacas inseminadas con espermatozoides positivos al FAA. En experimentos en los que se utilizó la monta natural, la fertilidad de los toros positivos al FAA fue 9% más alta que la de los toros negativos.

En conclusión, la evaluación *in vitro* de la calidad espermática es importante en la selección de reproductores, a la vez que ofrece información acerca del grado de preservación del semen durante el proceso de congelación. El espermatozoide es una célula que posee muchos atributos importantes para la fertilización, los cuales no pueden ser valorados realizando una sola prueba. Debe aceptarse el hecho, de que hasta el momento, no existe ninguna prueba de laboratorio, que por si sola pueda en forma confiable predecir la fertilidad del semen de un determinado macho. La tendencia moderna está dirigida a realizar estudios de regresión múltiple, en los que se combinen los resultados de las pruebas convencionales de evaluación seminal y los de las pruebas de funcionalidad, entre las que se incluyen la fecundación *in vitro*, la integridad de la cromatina o la reacción del acrosoma. La posibilidad de predecir la fertilidad de los machos incrementará, en la medida que a una muestra de semen se le realicen la mayor cantidad de pruebas que valoren los atributos de los espermatozoides para favorecer la fertilización y el desarrollo embrionario.

LECTURAS RECOMENDADAS

Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J Androl* 10: 89-98. 1989.

Rodríguez-Martínez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still Utopia? *Reprod Dom Anim* 38: 312-318. 2003.

Rota A, Penzo N, Vincenti L, Mantovani, R. Hypoosmotic swelling (HOST) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology* 53: 1415-1420. 2000.

Schneider CS, Ellington JE, Wright RW Jr. Relationship between bull field fertility and *in vitro* embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. *Theriogenology* 51: 1085-1098. 1999.

Ward F, Enright BP; Rizos D, Boland M, Lonergan P. 2002. Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gametes co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology* 57: 2105-2117. 2002.

Ward F, Rizos D, Boland MP, Lonergan P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology* 59: 1575-1584. 2003.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. En; *Physiology of Reproduction*. 2nd edition. Knobil, E; Neill, JD (eds). New York, Raven Press. Pp. 189-317.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodríguez-Martínez H. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Inter J Androl* 21: 207-216.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Haard MGH, Rodríguez-Martínez H. 1999. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessment of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-program. *Int J Androl* 22: 253-260.