

CAPÍTULO XXXV

PREDICCIÓN DEL POTENCIAL FÉRTIL DEL SEMEN BOVINO MEDIANTE PRUEBAS *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD FUNCIONAL ESPERMÁTICA

- I. INTRODUCCIÓN
- II. EVALUACIÓN SEMINAL Y PRUEBAS DE CAPACIDAD
FUNCIONAL ESPERMÁTICA
- III. PRUEBAS DE CAPACIDAD FECUNDANTE. ENSAYOS
DE INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO
- IV. PERSPECTIVAS FUTURAS Y DESARROLLO DE NUEVAS
PRUEBAS
- V. CONCLUSIONES
- VI. LITERATURA CITADA

Oscar Vera Muñoz
María Gladys Muñoz

I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de Venezuela la ganadería de doble propósito se ha difundido ampliamente en una gran cantidad de explotaciones ganaderas. Los bovinos de esta ganadería son el resultado del cruce indiscriminado y alterno de hembras criollas y mestizas con machos puros o mestizos (*Bos taurus* x *Bos indicus*) [15]. Para el desarrollo de esta ganadería mestiza se importa habitualmente semen y animales de raza pura. A menudo, este material importado se recibe sólo con referencias de su productividad en otras ganaderías, especialmente de lecheras de razas puras. De esta forma, cuando se necesita emplear semen de toros reproductores para los cruces correspondientes, se cuenta con material de procedencia diversa, en algunos casos con poca información de su fertilidad o capacidad fecundante y en otros con abundante información, incluso con referencias de su descendencia (pruebas de progenie).

Esto aunado al hecho de que el desarrollo de la ganadería de doble propósito avanza rápidamente y tiene amplios objetivos productivos, plantea la necesidad y el interés por validar la utilización de técnicas complementarias a la evaluación seminal tradicional. Técnicas que puedan demostrar rápida y cuantitativamente la capacidad fecundante del semen de procedencia diversa, en especial cuando no se dispone de referencias precisas para garantizar el éxito de los programas de doble propósito. Dichas técnicas deberán ser aplicables a semen fresco y congelado y predecir su capacidad fecundante, de manera que se pueda seleccionar semen de reproductores, respondiendo así a las exigencias y objetivos de la ganadería de doble propósito.

Tradicionalmente, el diagnóstico de la fertilidad del macho ha dependido de una evaluación descriptiva del eyaculado, con énfasis en la concentración, movilidad y morfología espermática [19]. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que no son sólo esos parámetros los predictores de la habilidad fecundante del espermatozoide sino también puede recurrirse a determinar la capacidad funcional del espermatozoide, es decir, su potencial de movimiento, viabilidad, capacitación, reconocimiento de la zona pelúcida, reacción de acrosoma, fusión gamética y formación de pronúcleos [1].

Se han desarrollado pruebas *in vitro* para evaluar la capacidad funcional de estas células. Una serie de bioensayos funcionales son utilizados actualmente y permiten examinar diferentes facetas del proceso normal de la fecundación. Algunos de ellos están destinados a estudiar las características de la movilidad espermática mediante el análisis computarizado del movimiento espermático, penetración del moco cervical, hiperactivación, etc., y otros detectan la interacción espermatozoide-ovocito utilizando pruebas como la penetración en ovocitos homólogos o heterólogos. Con la ayuda de estos ensayos funcionales, es posible predecir la capacidad fértil de los espermatozoides con una certidumbre razonable. El desarrollo futuro de esta área permitirá la adquisición de conocimientos fundamentales de los procesos espermátogénicos y funcionales en bovinos. Estos avances contribuyen a establecer criterios de selección de semen provenientes de toros reproductores, en particular cuando no se dispone de datos confiables de la eficiencia reproductiva de estos animales, en especial de toros mestizos, cuyas características son apreciadas en doble propósito.

Este Capítulo tiene como objetivo presentar un conjunto de técnicas que son complementarias al análisis tradicional para el diagnóstico de la capacidad fecundante del semen de toros de raza pura y su posible adopción para evaluar el producto de la descendencia de animales doble propósito.

II. EVALUACIÓN SEMINAL Y PRUEBAS DE CAPACIDAD FUNCIONAL ESPERMÁTICA

El examen microscópico directo de las características espermáticas que incluye la morfología, concentración, movilidad espermática y vigor de la movilidad es el procedimiento más simple para orientar acerca del potencial fecundante del semen. Por muchos años el examen de los parámetros seminales fue virtualmente el único método disponible para estimar el potencial fecundante del espermatozoide en humanos y en los animales domésticos. Tradicionalmente se ha utilizado el número de gestaciones viables y descendencia normal después de la inseminación *in vivo* (monta natural) para evaluar esa habilidad fecundante; sin embargo, este criterio no sería adecuado cuando una hembra presenta patologías o no se dispone de hembras, como es el caso de un Centro de procesamiento de semen. Actualmente, el resultado de la inseminación artificial (IA) y las pruebas de penetración de ovocitos *in vitro* se han constituido en nuevas técnicas para evaluar la habilidad fecundante del semen. Las pruebas *in vitro* de la habilidad fecundante del espermatozoide han mostrado en algunos casos ser más ventajosas que la propia fecundación *in vivo*. Una variedad de procedimientos *in vitro* han sido diseñados con este fin, pudiéndose agrupar en dos categorías principales:

- a. evaluación de las características celulares y de las características de movimiento espermático
- b. ensayos de penetración del ovocito por espermatozoides capacitados y reaccionados *in vitro*

La primera categoría de estos ensayos da información indirecta que orienta acerca de la habilidad fecundante, mientras la segunda proporciona información más directa. Ambos tipos de ensayos están correlacionados entre sí y aportan evidencias de la capacidad fecundante del semen. Sin embargo, no se les puede sustituir absolutamente por los ensayos *in vivo*.

1. Morfología

Dentro de la evaluación seminal convencional uno de los parámetros de gran importancia para determinar calidad seminal es la morfología espermática. Esta continúa siendo uno de los criterios más confiables como elemento para examinar el eyaculado porque es menos alterada por el proceso de recolección de semen [13]. En la determinación de problemas que afectan el potencial fértil de un toro reproductor el número de espermatozoides viables y libres de anomalías morfológicas se han convertido en parámetros de gran importancia [13].

El conocimiento de los mecanismos del transporte espermático en el tracto reproductivo de la hembra es necesario para la comprensión de la relación entre morfo-

logía y fertilidad. El tracto reproductivo de la hembra limita la habilidad de los espermatozoides morfológicamente anormales, atípicos, para alcanzar el sitio de fecundación en la unión ampula-itsmo. El paso a través del cervix, el útero y la unión útero-tubárica resulta difícil para los espermatozoides con anomalías morfológicas y no siempre alcanzan el sitio de fecundación [19]. Este sistema de filtro para los espermatozoides defectuosos no es absoluto y ocasionalmente un espermatozoide anormal pudiera llegar al ovocito y fecundarlo, sin embargo, lo más probable es que presente fallas en el desarrollo embrionario [13].

Normalmente se encuentran alrededor de 10 a 25% de formas anormales en los exámenes de rutina de eyaculados de toros reproductores [13]. El examen de la morfología se realiza de forma clásica con espermatozoides de semen fresco no diluido; el frotis se efectúa después de mezclar un volumen pequeño de semen ($20 \mu\text{l}$) con el colorante eosina-nigrosina ($\pm 20 \mu\text{l}$). Ese frotis tiene la ventaja de poder conservarse y de interpretarse con la ayuda de un microscopio de luz a 400 aumentos (400X) [14].

Para estudiar la morfología se ha venido usando el criterio de las atípicas primarias y secundarias. Las atípicas primarias tienen su origen durante la espermatogénesis; las secundarias tienen su origen en el proceso de maduración final del espermatozoide en el epidídimo [13, 14]. En la actualidad se recomienda prestar atención a la incidencia del tipo específico de célula anormal, dejando en segundo plano la clasificación de las anomalías espermáticas. Un toro para ser clasificado como satisfactorio respecto a la morfología, deberá tener por lo menos 70% de espermatozoides normales por eyaculado [20].

El Cuadro 1 muestra el sistema de clasificación basado en la influencia de cada atípica observada en eyaculados de toros sobre la fertilidad.

CUADRO 1. Anormalidades morfológicas mayores y menores [19]

Anormalidades morfológicas mayores

- | | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| a) gota citoplasmática proximal | d) defectos de la pieza media |
| b) cabeza periforme | e) cabeza mal desarrollada |
| c) cola fuertemente enrollada | f) defectos del acrosoma |

anormalidades morfológicas menores

- | | |
|-------------------------------|---|
| a) gota citoplasmática distal | d) inserción abaxial de la pieza media |
| b) cabeza desprendida | e) acrosoma anormal y desprendido |
| c) flexión de la cola | f) cabeza: estrecha, microcéfalo y macrocéfalo. |

2. Integridad del acrosoma

El examen de la morfología espermática constituye un examen de rutina en los laboratorios de control del semen de reproductores. Es posible evaluar algunas características de la morfología espermática que están involucradas en el proceso de fecundación, como lo son algunos organelos del espermatozoide, principalmente el acrosoma. Las aberraciones morfológicas del acrosoma en espermatozoides de toro se

han asociado con disminución en la fertilidad, estableciéndose varios grados, que van desde total esterilidad a subfertilidad [3]. El procedimiento para el examen del estatus acrosomal o prueba de la integridad del acrosoma requiere microscopios de muy buena calidad óptica y resolución; normalmente se usa un microscopio de contraste de interferencia diferencial o aún pudiera emplearse un microscopio de contraste de fase. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto o normal determinado por contraste de interferencia diferencial se correlaciona con las tasas de no-retorno al estro, según datos obtenidos en ganaderías de leche [3, 13]. Este examen puede realizarse en semen fresco y semen descongelado y sus resultados se pueden extrapolar a cualquier tipo de ganado, recomendándose un seguimiento en casos que se detecte alguna alteración a ese nivel.

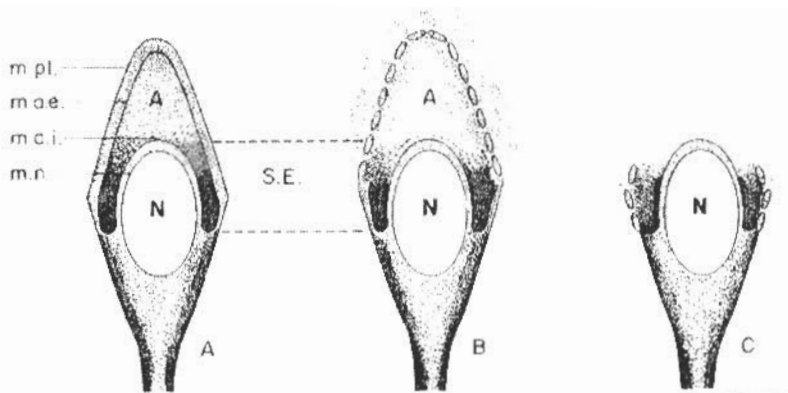
La integridad acrosomal se evalúa con un objetivo de inmersión de 1000X aumentos usando la óptica Nomarski o de interferencia diferencial. Para esta evaluación las muestras de semen se mezclan 1:1 (V/V) con buffer fosfato salino que contiene 0,25% de glutaraldehído. La óptica de interferencia diferencial permite identificar los acrosomas intactos sin teñir. Se cuentan al menos 100 espermatozoides y el criterio para determinar los acrosomas atípicos es la alteración del borde apical acrosómico [22].

3. Reacción del acrosoma

La reacción del acrosoma es prerrequisito para la fecundación [10], debiendo existir en un eyaculado normal una gran cantidad de acrosomas intactos. Una vez que el semen entra en contacto con las secreciones del tracto reproductivo de la hembra, los espermatozoides van liberándose del plasma seminal y se capacitan, es decir, experimentan cambios bioquímicos y morfofuncionales que les permiten llegar al sitio de fecundación, fijarse a la zona pelúcida del ovocito, induciendo la reacción del acrosoma. En esta reacción se fusiona la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa, y se liberan las enzimas acrosomales proteolíticas, entre ellas hialuronidasa y acrosina; esto permite al espermatozoide penetrar las cubiertas externas del ovocito y tomar contacto con la membrana plasmática [4].

La reacción del acrosoma es una capacidad funcional del espermatozoide que puede ser inducida experimentalmente por agentes naturales o sintéticos [6]. Puede ser inducida por incubación del semen de bovino con $1 \mu\text{mol/l}$ de ionóforo de calcio A23187 o con el medio Tyrode por 1 a 1.5 horas [8]. Luego los espermatozoides se fijan con formaldehído y se tiñen con 0.1% de naftol amarillo S y 0,1% (P/V) de eritrosina B [6]. Los frotis se observan en microscopía de campo claro. Si el borde apical del acrosoma está intacto, se tiñe rojo cereza y la parte dorsal y ventral se tiñe rosado [6]. La relación entre la inducción de la reacción del acrosoma *in vitro* y la fertilidad del semen bovino parece ser suficientemente estrecha para sugerirla como prueba de predicción de la capacidad fecundante del semen de toros reproductores [8].

Figura 1. Reacción del Acrosoma. A): Acrosoma intacto; B): Acrosoma en reacción, C) Acrosoma reaccionado



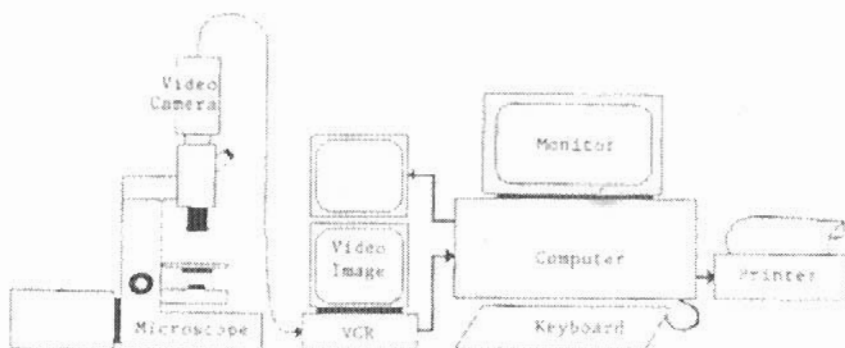
4. Movimiento espermático

La determinación clásica de la movilidad espermática es habitualmente un examen al microscopio del porcentaje de espermatozoides móviles. Este es el método más simple, rápido y económico para examinar este parámetro; sin embargo, es altamente subjetivo y poco valioso si lo relacionamos con la capacidad fecundante del espermatozoide [13]. Muchas veces se tiende a sobreestimar el porcentaje de espermatozoides móviles en muestras con alta concentración espermática. Al inicio, para determinar la movilidad se fotografiaba la posición del espermatozoide consecutivamente cada cierta fracción de tiempo. Actualmente se pueden filmar estos movimientos con cámaras de video unidas al microscopio y se determina el número de espermatozoides móviles por campo, la velocidad, su trayectoria etc. Recientemente se han desarrollado sistemas CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer) [1] que estudia el movimiento espermático e identifica y registra varios patrones de movimiento en las muestras de semen. Con el sistema CASA se puede determinar el parámetro linealidad y el Índice de linealidad espermático en el eyaculado.

5. Análisis del movimiento espermático

El espermatozoide para ser funcional debe expresar sus atributos de movimientos característicos y diferentes para cada una de las etapas del proceso de fecundación del ovocito [1]. El espermatozoide eyaculado tiende a exhibir trayectorias en progresión lineal, tipo de movimiento que le permitirá penetrar las barreras cervicales. Durante la capacitación espermática el batido del flagelo se hace más amplio, la amplitud y simetría de la onda cambia, aumenta la velocidad y el espermatozoide exhibe una forma de movimiento hiperactivada que facilita la penetración de la zona pelúcida [1]. Este patrón de movimiento da como resultado un tipo de movimiento curvilíneo que puede ser identificado y cuantificado por los sistemas CASA (Figura 2). Actualmente se usa un modelo de fecundación *in vitro* para inducir experimentalmente la hiperactividad en la muestra de semen que se desea evaluar para su potencial fecundante.

Figura 2. Componentes del sistema CASA.



Este sistema ha sido bien desarrollado en humanos y numerosas especies, al haberse demostrado que la hiperactividad es el atributo de movimiento más importante en la predicción del potencial fecundante del espermatozoide [1]. Los espermatozoides a los que se les induce hiperactividad en el sistema *in vitro* expresarán una capacidad funcional espermática estrechamente relacionada con la capacidad de unirse y fecundar al ovocito. Los criterios usados para la detección de la hiperactividad espermática han sido señalados en humanos [1]:

Criterio	Valores en Humanos
Velocidad curvilínea	> 90 μm / segundo
Linealidad	< 20%

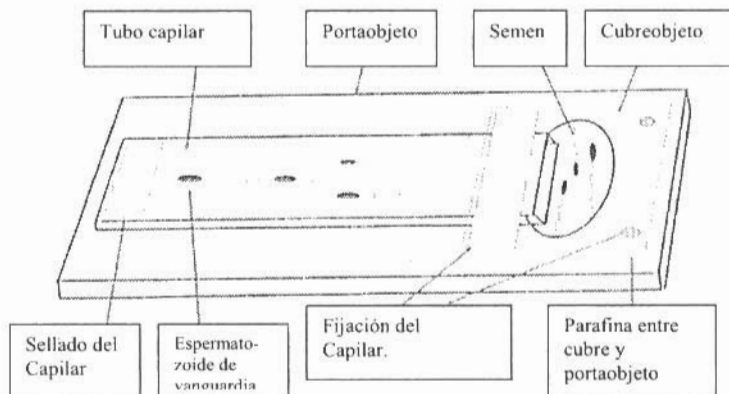
El analizador de semen CASA que se denomina Hamilton en bovinos ha permitido el desarrollo de programas computarizados para el análisis cuantitativo rápido del movimiento y de la concentración espermática del bovino, a la vez que analiza imágenes para evaluar individualmente la morfología espermática de cientos de espermatozoides [13]. El sistema puede medir simultáneamente varios parámetros de motilidad incluyendo la movilidad individual, movilidad progresiva lineal, velocidad, linealidad del movimiento espermático, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide y frecuencia del batido del flagelo de cada espermatozoide [13]. Aunque estos sistemas son relativamente costosos están siendo utilizados en muchos Centros de congelación de semen a nivel mundial y nacional los cuales se encuentran en la etapa de recolección de evaluaciones estadísticamente válidas para cada uno de los parámetros analizados.

6. Penetración del moco cervical

La prueba original de penetración del moco cervical fue desarrollada para humanos examina la capacidad y habilidad del espermatozoide para migrar a través del

moco cervical contenido dentro de un tubo capilar. Está basada en que el moco cervical es la primera barrera que el espermatozoide encuentra en el tracto genital de la hembra. El moco cervical está compuesto de mucina (sialoglicoproteína) que es producida por las células epiteliales de las criptas cervicales [13]. La prueba ha sido adaptada para evaluar espermatozoides de toro usando solo moco cervical de vaca en celo, ya que la composición de la matriz sialoglicoproteica varía a través del ciclo estral de la vaca. Debido a la imposibilidad de conseguir fácilmente moco cervical estrual, este ha sido sustituido por un compuesto sintético, la poliacrilamida, con alta repetibilidad y cuantificación de las tasas de migración de los espermatozoides. Un tubo capilar rectangular conteniendo poliacrilamida es colocado y fijado sobre un portaobjeto (Figura 3), colocando la muestra espermática en un extremo del tubo. Luego de 10 minutos se incuba a 38°C y se determina la distancia en milímetros recorrida por el espermatozoide de vanguardia con mayor progresión.

Figura 3. Prueba de penetración del moco cervical

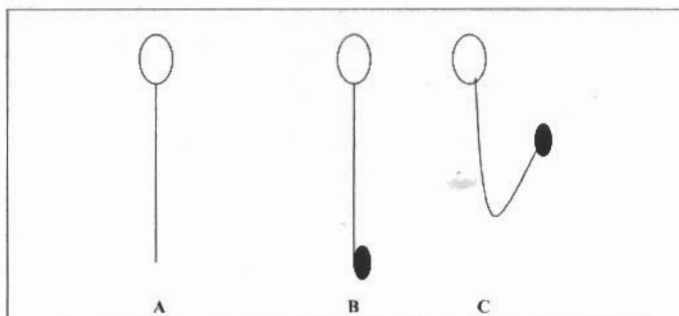


La distancia de penetración en milímetros en el moco cervical tiene una alta correlación con las tasas de concepción al utilizar semen de toros evaluados para la prueba de la penetración del moco cervical [13].

7. Test Hiposmótico (HOS)

Un aspecto de relevancia para evaluar la capacidad funcional del espermatozoide es la integridad funcional de la membrana plasmática, la cual es imprescindible en varios eventos de la fecundación como la capacitación, reacción del acrosoma y fusión con el ovocito [9]. La integridad funcional de la membrana del espermatozoide puede ser rápidamente determinada usando la prueba hiposmótica o test de HOS (Hypo-Osmotic Swelling). Esta simple prueba se basa en el concepto fisiológico de la semipermeabilidad de las membranas plasmáticas intactas y bioquímicamente activas de los espermatozoides vivos, las cuales se hinchan cuando son expuestas a una solución hiposmótica, mientras las membranas dañadas no lo hacen [12]. Bajo un ambiente hiposmótico se produce un influjo de agua el cual resulta en una expansión del volumen a nivel de la cola del espermatozoide (Figura 4).

Figura 4. Resultado del test de hiposmósis. A): Espermatozoide no hinchado (membrana dañada). B): Espermatozoide hinchado (membrana intacta, semipermeable). C): Espermatozoide hinchado (membrana intacta)



Para bovinos se coloca de 5 a 10 μl de semen en una solución de fructosa y citrato de sodio a 150 mOsmKg⁻¹. Se puede evaluar semen fresco y descongelado. Los espermatozoides hinchados se cuantifican con un microscopio de contraste de fase y se estiman los espermatozoides con membrana intacta. En algunas especies se ha estimado que 60% de membranas intactas es un valor normal para semen fresco [29]. Esta prueba se correlaciona altamente con la fertilidad de semen de los toros reproductores [23].

8. Técnicas de recuperación de espermatozoides móviles

Existen técnicas de recuperación de espermatozoides móviles que sirven para evaluar no solo su capacidad de movimiento y viabilidad sino también para mejorar la calidad del semen con que se insemina.

- Técnica de swim-up o nado hacia arriba. Consiste en la colocación de semen (250 μl) en el fondo de un tubo bajo un medio especial de migración, el cual contiene iones sodio y potasio en proporciones adecuadas para estimular el metabolismo espermático, además de calcio, glucosa, etc. y un aceptor de colesterol como albúmina de suero bovino (BSA). Se usan medios preparados a un pH entre 6.9 y 7, incubándose el tubo a 37-38°C por un período entre 45 a 60 minutos dependiendo si es semen fresco o congelado [28]. Se recupera un volumen (400 μl) de la superficie del tubo, donde se encuentran los espermatozoides de mejor movilidad (Figura 5). Este procedimiento puede incrementar la proporción de espermatozoides móviles y vigorosos, separándolos de los inmóviles y detritus, por lo que se utiliza en la preparación de semen para fecundación *in vitro*. Evalúa la capacidad móvil y de sobrevivencia de los espermatozoides además de iniciar el proceso de capacitación [5]. La tasa de recuperación de espermatozoides móviles es de aproximadamente 30% para semen fresco de bovino como se ha señalado en toros Brahman [28].
- Técnica de Percoll o de separación de espermatozoides móviles por centrifugación en un gradiente discontinuo. Técnica muy sencilla que consiste en la centrifugación de la muestra de semen (500 μl para semen fresco bovino [28], colocada en la superficie de un gradiente discontinuo de Percoll (Figura 6). El Percoll es un

Figura 5. Esquema del procedimiento de la técnica de swim-up [28]

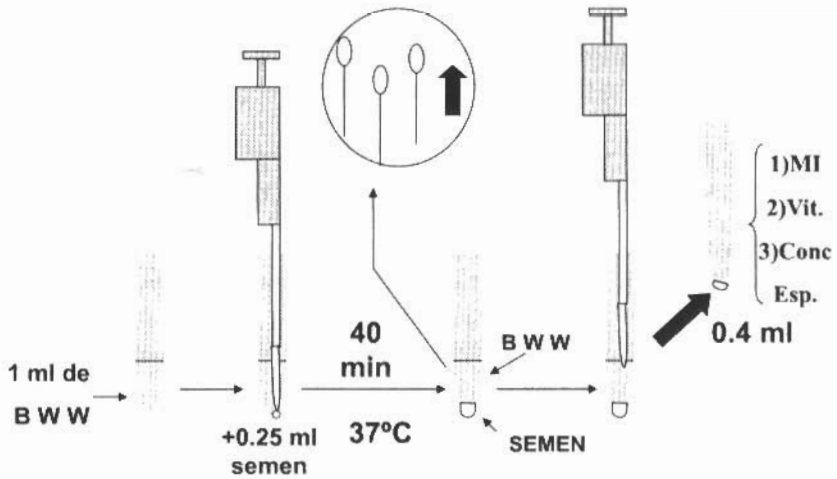
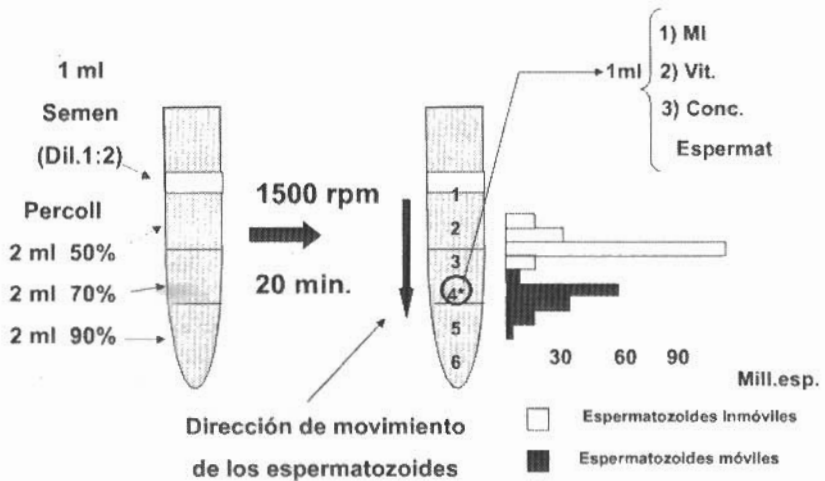


Figura 6. Esquema del procedimiento para la técnica de separación de espermatozoides móviles por centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll para bovino [28]

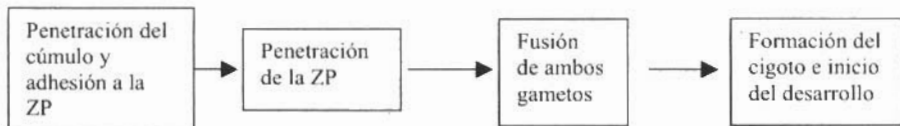


compuesto sintético que en suspensión forma un tramado que dificulta el paso de los espermatozoides, seleccionando por centrifugación y por capacidad de movimiento los espermatozoides más móviles y libres de atipias. El Percoll para semen fresco tiene un porcentaje de recuperación de espermatozoides móviles de 10% (20% menos que la técnica de swim-up) [28].

III. PRUEBAS DE CAPACIDAD FECUNDANTE DEL ESPERMATOZOIDE. ENSAYOS DE INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVOCITO

La interacción del espermatozoide con el ovocito y la penetración de este comprende varias etapas que deben cumplirse hasta culminar con la formación del cigoto y el inicio del desarrollo embrionario. Ellas son:

Interacción espermatozoide-zona pelúcida: Adhesión y Penetración de la zona pelúcida



1. Interacción del espermatozoide con la zona pelúcida

El ovocito se libera del folículo rodeado de las células del cúmulo oóforo y de la zona pelúcida (ZP). La penetración del espermatozoide entre las células del cúmulo se realiza gracias a enzimas espermáticas, tomando contacto con la segunda cubierta, la ZP. La ZP es una matriz acelular de naturaleza glicoproteica que rodea al ovocito; su importancia reside en que proporciona el sitio de reconocimiento espermatozoide-ovocito e induce la reacción acrosómica, requisito fundamental que debe experimentar el espermatozoide para adquirir su capacidad fecundante. La ZP está compuesta por diferentes moléculas de glicoproteínas: ZP3 representa el receptor primario y al mismo tiempo inductor de la reacción del acrosoma, en tanto que ZP2 está comprometida en la unión del espermatozoide al ovocito [1].

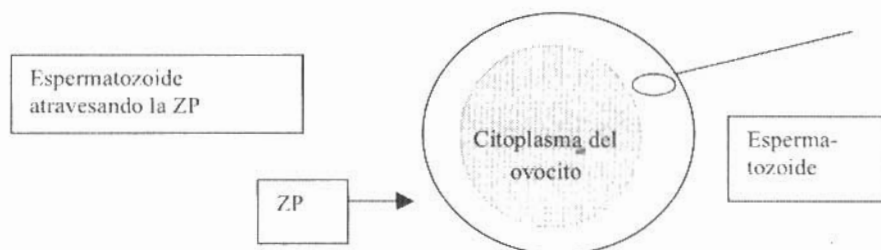
Se ha utilizado la cuantificación de la unión de los espermatozoides a la ZP como un ensayo de predicción de la capacidad del espermatozoide para interactuar con ella [11]. Este bioensayo orienta acerca de la capacidad de los espermatozoides para reconocer y adherirse a la ZP, barrera previa que debe ser penetrada, para alcanzar la membrana plasmática del ovocito y culminar el proceso de la fecundación. La cuantificación del número de espermatozoides adheridos a la ZP es un indicador de la normal interacción de espermatozoide con receptores de la ZP [13].

2. Penetración de la ZP

La penetración del espermatozoide a través de la ZP es un evento clave que requiere de la simultaneidad de un fenómeno esencial como es la reacción del acrosoma (RA), la cual es disparada la ZP3, una molécula de la ZP. La RA favorece la liberación de enzimas proteolíticas almacenadas en el acrosoma que hacen posible que el esper-

matozoide penetre la ZP [24]. Sin embargo, no ha sido posible disponer de un bioensayo que permita discriminar entre espermatozoides reaccionados y no reaccionados, ya que los espermatozoides reaccionados lejos del ovocito habrán liberado sus enzimas acrosomales y cuando lleguen al lugar de encuentro con el ovocito no estarán en condiciones de interactuar con la ZP y penetrarla (Figura 7) [24].

Figura 7. Penetración de la zona pelúcida



El paso del espermatozoide a través de la ZP se puede verificar a través de la observación de ovocitos recuperados de ovarios de vacas de matadero, que una vez madurados *in vitro* son puestos en contacto con espermatozoides capacitados.

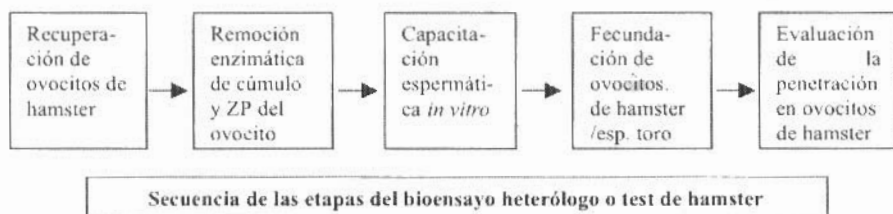
3. Test de hamster

Cuando no existen las facilidades para conseguir ovocitos de vaca se puede utilizar el test de hamster [30]. Esta prueba pone en evidencia la habilidad del espermatozoide capacitado y reaccionado de toro para penetrar al ovocito de hamster libre de ZP. Se basa en la propiedad del ovocito de hamster de dejarse penetrar por espermatozoides heterólogos, incluyendo el humano, con lo cual se ha convertido en un bioensayo valioso para determinar la capacidad fecundante de espermatozoides de diferentes especies. Desde un punto de vista clínico se correlaciona con los resultados de la fecundación homóloga y con la tasa de fecundación *in vitro* e *in vivo* [5], con la preñez de los sementales y con el grado de movilidad de los espermatozoides.

Es un bioensayo laborioso que requiere la preparación de los ovocitos de hamster, tratados químicamente con enzimas para eliminar la ZP, debido a que la penetración de la ZP es un evento específico de cada especie y no sería posible que un espermatozoide de toro penetrara la ZP de un ovocito de hamster. Los resultados de esta prueba son buenos indicadores de la capacidad de penetración de los espermatozoides siendo este bioensayo el más completo para probar la capacidad fecundante del espermatozoide y cuando se duda de esta capacidad. Resulta de gran aplicación cuando no se dispone de ovocitos de la misma especie, como para realizar la penetración homóloga del ovocito.

En la secuencia de este bioensayo heterólogo los espermatozoides de toro deben capacitarse y experimentar la RA, eventos previos para fusionarse con la membrana del ovocito de hamster. Demanda del manejo y manipulación de los ovocitos de

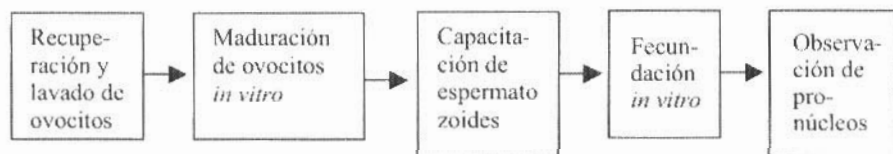
hamster que deberán ser recuperados del oviducto y una vez removido el cúmulo oóforo, tratados con tripsina o quimotripsina para eliminar la ZP, de lo contrario los espermatozoides no penetrarían. Cabe destacar que la calidad de los ovocitos es confiable porque se trabaja con ovocitos post ovulación, por lo tanto existe certeza de que están maduros.



4. Bioensayos de penetración homóloga: Fecundación *in vitro*

Uno de los bioensayos más relevantes para demostrar la capacidad fecundante del espermatozoide es la penetración de ovocitos de vaca, es decir, se trata de poner a prueba al espermatozoide. Para que el espermatozoide penetre las células del cúmulo oóforo que rodean a la ZP deberá poseer una movilidad eficaz y para adherirse a la ZP deberá además de estar capacitado y haber experimentado la RA. De esta manera las enzimas que se liberan cuando ocurre el proceso, facilitarán su penetración; es en esas condiciones que el espermatozoide deberá fusionar su membrana plasmática con la membrana plasmática del ovocito [25]. El cumplimiento exitoso de todas estas etapas garantiza su capacidad fecundante. El inicio del desarrollo del cigoto constituye la etapa siguiente que pondrá a prueba el potencial genético aportado por ambos gametos.

La penetración homóloga es consecuencia de la utilización de ovocitos recuperados del ovario de vacas ya sea de finca o de matadero puestos en contacto con espermatozoides de toro. Representa un recurso importante cuando no se cuenta con facilidades para manipular vacas en las fincas y se desea demostrar la capacidad fecundante de los espermatozoides. Este bioensayo requiere de condiciones de laboratorio básicas que se pueden resumir en el siguiente esquema de penetración homóloga o FIV.

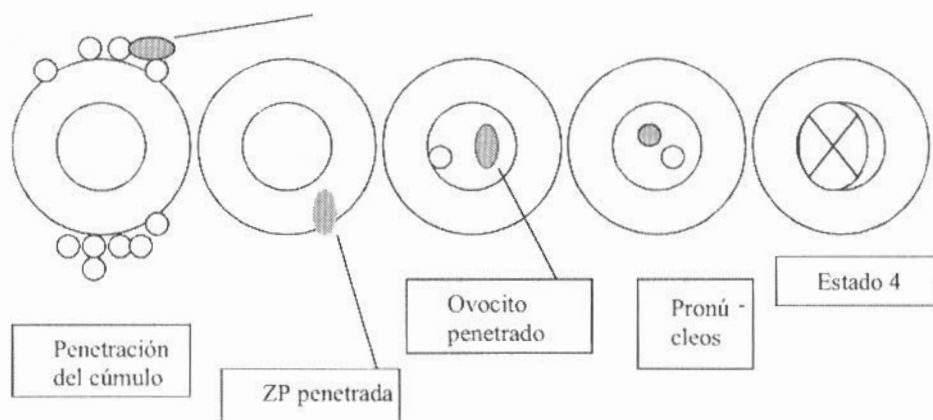


Naturalmente el bioensayo ideal para probar la capacidad fecundante del espermatozoide es la penetración del ovocito de vaca por espermatozoides capacitados de toro. El criterio para evaluar el resultado de esta prueba es la formación de pronúcleos

femenino y masculino o la división del cigoto, primero en 2 y luego en 4 células, lo que se denomina estado 2 o 4.

Para la realización de la FIV se requiere de ovocitos maduros, los que se pueden obtener por aspiración de folículos vía transvaginal en vacas superovuladas o por recuperación de ovocitos de ovarios de vacas de matadero, los cuales requieren de una incubación en ambiente gaseoso adecuado (5% CO₂) y medios de cultivo suplementados con nutrientes y hormonas para lograr su maduración [17]. Es necesario asegurarse que los ovocitos usados sean de buena calidad [7], es decir que se encuentren maduros, de lo contrario no será posible la penetración de la ZP, a pesar que los espermatozoides se encuentren capacitados y en buenas condiciones de vitalidad.

El siguiente esquema ilustra las etapas de la FIV que deben cumplirse para lograr resultados que demuestren la capacidad fecundante del espermatozoide y en consecuencia la calidad del semen:



Es aconsejable evaluar en un Centro de Producción de semen, la calidad del semen congelado, aunque haya sido evaluado antes de la congelación; de esta manera se confirma que el proceso de congelación no ha alterado la capacidad fecundante original de los espermatozoides. En el Programa de control de calidad del Centro debe incluirse, la revisión de la calidad del semen congelado y almacenado, ya sea por técnicas tradicionales o de avanzada.

5. Criterios de evaluación de la fecundación

El criterio más estricto para evaluar la capacidad fecundante de los espermatozoides es demostrar que interactúan con el ovocito y sus cubiertas, que las penetran y que se fusionan con la membrana del ovocito, para culminar con la formación y fusión de pronúcleos femenino y masculino, lo cual significa la formación del cigoto. Un criterio más estricto para evaluar la capacidad fértil del espermatozoide sería observar el inicio del desarrollo embrionario, es decir de la segmentación, hasta llegar al estado de por lo menos 2 blastómeros. Sin embargo, a partir del momento en que se produce la fusión de los gametos van a jugar su rol otros factores, en particular la calidad del

ovocito y las condiciones de incubación *in vitro*. Esto justifica que se continúen las investigaciones para identificar los distintos factores que son claves desde el punto de vista biológico, cuyo conocimiento permitirá seguir avanzando en el perfeccionamiento tecnológico.

IV. PERSPECTIVAS FUTURAS Y DESARROLLO DE NUEVAS PRUEBAS

A medida que progresa el conocimiento de la Biología Celular y Molecular, se han identificado factores de naturaleza bioquímica que son de gran importancia para evaluar las características funcionales de los espermatozoides. Se mencionan a continuación algunos de ellos.

1. Marcadores Bioquímicos de la función espermática

Existen criterios bioquímicos para evaluar la calidad de los espermatozoides, entre ellos la determinación de la enzima creatina kinasa en los espermatozoides y la presencia de especies oxígeno reactivas (EOR) [18]. La creatina kinasa es una enzima clave en la transferencia de energía. En diferentes especies se ha demostrado que cuando se presenta oligozoospermia o presencia de espermatozoides inmaduros la creatina kinasa está 10 a 20 veces aumentada. También se ha observado una correlación positiva entre el aumento de creatina kinasa y las anomalías morfológicas en forma y tamaño de la cabeza del espermatozoide; para explicar esta asociación se ha postulado que son defectos producidos en la última etapa de la espermatogénesis [18]. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que la expresión de CK ocurre en la última etapa de este proceso.

EOR son moléculas normalmente presentes en el semen, pero cuando sus concentraciones aumentan en forma excesiva pueden generar alteraciones de la membrana espermática y de su ADN, es decir, de su patrimonio genético. Un proceso inflamatorio en el tracto genital masculino generado por agentes físico-químicos como golpes, calor, frío, agentes químicos o infecciosos, pueden causar daños irreversibles al espermatozoide por aumento de EOR. Tanto los espermatozoides como los leucocitos presentes en el semen pueden producir EOR [2]. El plasma seminal posee neutralizadores y enzimas antioxidantes que protegen a los espermatozoides de los efectos de EOR, pero cuando sus niveles no son suficientes, como en algunos casos de inflamación e infecciones, podrían dañarse los espermatozoides a nivel de membrana y ADN, afectando su función [26]. Existen kits comerciales que permiten medir las concentraciones de EOR en el semen, lo que representa una herramienta que podría ser muy útil para detectar este tipo de problema.

2. Vitalidad espermática y características morfo-funcionales del espermatozoide

En la última década se han desarrollado técnicas de tinción con fluoresceína para determinar características funcionales de los espermatozoides, no sólo para reconocer porcentaje de espermatozoides vivos en el semen sino también estado del acrosoma o la integridad y permeabilidad de la membrana del espermatozoide [16]. Estas

técnicas utilizan colorantes simples o en combinaciones. Recientemente se han presentado combinaciones comerciales de estos colorantes que señalan en forma rápida y directa tales características espermáticas.

IX. CONCLUSIÓN

Es de interés destacar que no se trata de aplicar un gran número de pruebas para predecir el potencial fértil del espermatozoide; solo se trata de conocer sus ventajas y la factibilidad para aplicarlas de acuerdo con el resultado de la evaluación tradicional. Por lo tanto deberán existir criterios para seleccionar las diferentes técnicas según la necesidad de evaluar determinadas características del semen., tales como: capacitación espermática, interacción con los componentes del tracto genital, interacción con las cubiertas del ovocito e interacción con el ovocito. La aplicación de estas pruebas deberá guardar relación con la propiedad del espermatozoide que se desea investigar. Se espera que los avances en la fisiología de gametos y en la biotecnología ayuden a desarrollar pruebas cada vez más seguras que permitan predecir la capacidad fecundante del espermatozoide de toro, con el propósito de recomendar, según sus resultados, un adecuado tratamiento del semen. De esa forma será posible contribuir al éxito del desarrollo de la ganadería de doble propósito. El aporte de estas técnicas sólo tendrá valor si se acepta que el mejoramiento de la producción ganadera requiere del esfuerzo multidisciplinario de todos los profesionales involucrados en el área de la producción.

VI. LITERATURA CITADA

- [1] Aitken, R., Irvine, D. 1998. Assessment of semen quality. In: Treatment of infertility: the new frontiers. Eds. Filicori, M. and Flamigni, C. Communications Media for Education, Inc., New Jersey, USA. Chap. V: 97-106
- [2] Aitken, R.J., Buckingham, D.W., West, K., Brindle, J. 1996. On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. *Am. J. Reprod. Immunol* 35: 541-551
- [3] Anderson, M., Vierula, M., Alanko, M. 1990. three types of acrosomal aberrations of bull spermatozoa and their relation to fertility. *Acta vet. scand.* 31: 175-179.
- [4] Arrau, J., Bustos, E., Hoecker, G., Ramos, A. 1981. En: *Biología de la Reproducción Animal*. 1ra. Edición. Editorial Andrés Bello, Santiago, Chile. Cap. VII: 135-156
- [5] Bavister, B.D. 1989. Tests of Sperm Fertilizing Ability. In: *Gamete Physiology*. Ed. Asch, R., Balmaceda, J. y Johnston, I. SERONO Symposia, USA. pp. 77-105.
- [6] Bryan, J., Akruk, S. 1977. A naphthol yellow S and erythrosine B staining procedure for use in studies of the acrosome reaction of rabbit spermatozoa. *Stain Technology*.52 (1): 47-51.
- [7] Centeno I., Proverbio F., Muñoz M.G. 1999. Efecto del factor liberador de la hormona de crecimiento sobre la calidad ovocitaria y la tasa de fecundación en *Mesocricetus auratus*. XVI Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana. Marbella Chile Septiembre 1999. R-39:47
- [8] Christensen, P., Whitfield, C., Parkinson, T. 1994. The use of bright field microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. *Theriogenology* 42: 655-662.

- [9] Correa, J., Zavos, T. 1994. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42: 351-360.
- [10] Cross, N., Watson, K. 1994. Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology* 42: 89-98.
- [11] Dejarnette, J.M., Saacke, R.G., Woelders, H. 1992. Accessory Sperm: Their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 70:184-191.
- [12] Drevius, L. 1979. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 42: 136-156.
- [13] Garner, D.L. 1997. Ancillary Tests of Bull Semen Quality. *Veterinary Clinics North America* 13(2): 313-330.
- [14] Goffaux, M. 1991. L'examen approfondi des anomalies morphologiques de la semence du taureau. *Élevage et insemination* 244: 3-14.
- [15] González-Stagnaro, C. 1998. El Manejo de la Calidad Total en los Programas de Control de los Problemas Reproductivos en Hatos Bovinos Mestizos. En *Mejora de la Ganadería de Doble Propósito*. González-Stagnaro, C., Madrid, N y Soto-Belloso, E. (eds). Ed. Astro Data, S.A. Maracaibo. (Venezuela). Cap. XXIX:581-607
- [16] Harrison, R.A.P., Vickers, S.E. 1990. The use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian sperm. *J. Reprod. Fertil.* 88: 343-352.
- [17] Hernández, H. 2001 Fertilización *in vitro*. En, *Reproducción Bovina*. Carlos González Stagnaro (ed). Fundación Girarz. Editorial Astro Data, Maracaibo- Venezuela. XXVI: 411-426.
- [18] Huszar, G., Vigue, L. 1998. The role of Biochemical Markers of Sperm Maturity in the Selection of Sperm for Assisted Reproduction. Eds. Filicori, M. and Flamigni, C. Communications Media for Education, Inc., New Jersey, USA In: *Treatment of Infertility. The New Frontiers*. Chap. VI: 107-122
- [19] Johnson, W. 1997. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 13 (2): 255-270.
- [20] Madrid, N. 1998. Modificaciones en el sistema de evaluación reproductiva de los toros. *Venezuela Bovina* 39: 15-16.
- [21] Oehninger, S., Franken, D., Sabed, E., Barroso, G., Kolm, P. 2000. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta análisis. *Hum. Reprod. Update* 6 (2):160-168
- [22] Parrish, J., Foote, R. 1987. Quantification of bovine sperm separation by swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J Androl* 8: 259-266.
- [23] Revell, S., Mrode, R. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science* 36: 77-86.
- [24] Saacke, R.G., Dejarnette, J.M., Nebel, R.L. 1991. Assessing bull fertility. In *Proceedings Annual Meeting Soc. Theriogenology* pp 56-69.
- [25] Seidel, G.E. Jr., Allen, C.H., Brink, Z. 1995. Insemination of Holstein heifers with very low number of unfrozen spermatozoa. *J. Animal Sci* 73 (Supp 1): 232
- [26] Sharma, R.K., Agarwal, A. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48:835-850.

- [27] Vera, O., Muñoz, G., Jaffe, K. 1998 Wave parameters of the sperm flagellum as predictors of human spermatozoa motility. *Andrologia* 30:153-157.
- [28] Vera, O., Bastidas, P., Vásquez, L.A. 2001. Mejoramiento *in vitro* de las características espermáticas con la técnica de Swim-up y percoll en semen fresco de toros Brahman de la E.E. La Cumaca. V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias, 25 al 29 de Septiembre del 2001, Maracay, Estado Aragua. Venezuela. CD-1
- [29] WHO. 1999. Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Fourth Edition. Cambridge University Press. UK.
- [30] Yanagimachi, R. 1981. Mechanisms of fertilization in mammals. In: Mastroianni L., Biggers, J.D. (eds). Fertilization and embryonic development *in vitro*. New York. Plenum Press. pp 81- 182.