

EL ANÁLISIS SEMINAL COMO HERRAMIENTA PARA PREDECIR EL POTENCIAL REPRODUCTIVO EN TOROS

SEMEN ANALYSIS AS A TOOL TO PREDICT THE REPRODUCTIVE POTENTIAL IN BULLS

Armando Quintero Moreno^{1*}, José Manuel Mayorga-Torres², Walter Cardona Maya²

¹Laboratorio de Andrología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

²Grupo Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Calle 52 # 61-30, Laboratorio 534. Teléfono: 57 4 2196476. * La correspondencia debe ser dirigida a (Correspondence should be addressed to): A. Quintero Moreno; e-mail: armando.quintero@fvc.luz.edu.ve

RESUMEN

La eficiencia de la producción y la calidad animal debe estar acompañada de herramientas genéticas y reproductivas, dos componentes de gran importancia que se deben tener en cuenta en la implementación de proyectos de producción animal. La evaluación de la calidad espermática es un requisito indispensable para el desarrollo de programas de inseminación artificial, en el que el semen utilizado mantenga la habilidad de fecundar después de ser crio-preserved. En el área de la reproducción animal se busca un "análisis seminal ideal" que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal. Sin embargo, este análisis integral es muy difícil de desarrollar, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática. El análisis de semen ideal sería aquél que de forma sencilla y eficaz permitiera predecir la capacidad fecundante de un eyaculado. La implementación de metodologías que describan características funcionales y fisiológicas espermáticas cobra valor al ser el único método en el laboratorio que representa la capacidad fecundante del toro. El conocimiento de la calidad espermática de cada toro se convierte en uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino, un requisito indispensable para el desarrollo de las tecnologías de reproducción asistida.

Palabras clave: Calidad; Espermatozoide; Análisis; Funcional; Fertilidad.
JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2017) 2(1):30-37

ABSTRACT

Efficiency of animal production must take into account the genetic and reproductive tools, two important components in the farming system. The assessment of sperm quality is a prerequisite for the development of artificial insemination programs, in which the used semen must maintain the fertilize ability after being cryopreserved. In the field of animal reproduction, there is still a search for a "prognostic seminal analysis" able to adequately predict the stud fertility of an out from a semen sample. However, this comprehensive analysis is difficult to develop due to the inherent complexity on the sperm physiology. The ideal semen analysis would be the one that allow predict in a simple and effective way the fertilizing capacity of an ejaculate. The implementation of methodology that describe functional and physiological sperm characteristics charge value to be the only method in the laboratory representing the fertilizing capacity of bull. Knowledge of the quality of each bull sperm becomes one of the main objectives in the production of bovine semen, a prerequisite for the development of assisted reproductive technologies.

Keywords: Quality; Sperm; Analysis; Functional; Fertility.
JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2017) 2(1):30-37

Received/Recibido: 16/08/2016; Accepted/Aceptado: 10/12/2016

Copyright: © 2017 Quintero-Moreno et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la [Licencia Creative Commons Attribution](#), la cual permite el uso irrestricto, la distribución y reproducción en cualquier medio, dando el crédito correspondiente al autor y la fuente original / This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es el principal objetivo en la producción de semen bovino. La búsqueda de un análisis seminal que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra cobra vital importancia en el contexto de la reproducción animal; sin embargo, este análisis integral es difícil de desarrollar debido a la complejidad inherente de las células espermáticas.

Las características que han descrito tradicionalmente la calidad de un eyaculado han sido la concentración, la movilidad, la movilidad progresiva, la viabilidad y la morfología; parámetros cualitativos que no permiten predecir realmente la fertilidad y calidad de la muestra de semen (Sharma et al., 2016). En la actualidad no existe una prueba capaz de relacionar la capacidad fecundante, frente a los parámetros cualitativos convencionales y es por esta carencia que se requiere de estudios más profundos sobre la fisiología espermática y su interacción con el ambiente uterino y oviductal. Sin embargo, se han propuesto parámetros adicionales que permitan describir características del eyaculado asociadas al estado de los espermatozoides en un momento dado y que pueda ser correlacionado con calidad del mismo. Guillant et al., 2008, han demostrado que existe correlación confiable y repetible entre distintas pruebas *in vitro* con la fertilidad; aunque hasta la fecha no se puede traducir el resultado arrojado por el espermograma en porcentaje de preñez de una determinada inseminación o de un toro en particular, por lo tanto, para lograr algún progreso en este sentido se debe abordar la calidad seminal desde diferentes puntos de vista con el fin de obtener una comprensión de los posibles factores derivados del análisis seminal que impactan en la tasas de preñez.

Existe una conexión entre un semen fértil y sus parámetros cuantificables, no obstante, aún no se ha encontrado cuál de estos parámetros espermáticos convencionales o funcionales predicen la capacidad fecundante de un eyaculado (Gillan et al., 2008; Shojaei et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Varios métodos han sido usados para predecir la fertilidad, pero solo pocos se siguen aplicando para tal fin. La mayoría de estos estudios se han realizado utilizando un microscopio óptico y un operador para hacer las evaluaciones seminales, evaluando variables cualitativas y subjetivas. La importancia de esta revisión es puntualizar sobre los principales parámetros de calidad seminal que han servido de herramienta de investigación para predecir la fertilidad en toros.

MOVILIDAD ESPERMÁTICA

La movilidad espermática, masal o individual, es la característica que permite evaluar la capacidad de desplazamiento de los espermatozoides de toros, siendo un parámetro tradicionalmente analizado mediante microscopía de luz, por un operador entrenado, clasificando el movimiento de cada célula. A pesar de la subjetividad que genera este método, es la forma más accesible y económica de determinar la calidad de movimiento espermático en una muestra seminal; sin embargo, esta evaluación de rutina no es capaz de estimar el potencial reproductivo de un toro (Morado et al., 2015; Sharma et al., 2016) o detectar variaciones en la movilidad, ni tampoco de determinar patrones de sub-poblaciones espermáticas presentes en un eyaculado, que puedan estar relacionadas con la fertilidad. La implementación de un sistema computarizado, genéricamente llamado CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), permitió describir a través del seguimiento del desplazamiento, características del movimiento flagelar de los espermatozoides asociándolas a el estatus funcional los espermatozoides (Kastelic & Thundathil, 2008), tales como: concentración, porcentaje de móviles y rápidos >25 mm/segundos (RAP,%), velocidad media promedio (VAP, mm/s), linealidad media (LIN; VSL/VCL x 100%), y desplazamiento lateral de la cabeza (LDH, mm) (Munuce et al., 2006) los cuales describen de forma cuantitativa y de forma objetiva la movilidad espermática.

La movilidad total cuantificada por el CASA presenta una correlación de media a baja respecto a la fertilidad *in vivo*, no obstante la combinación de otros parámetros más detallados de movimiento flagelar valorados mediante el CASA han sido correlacionados positivamente con la fertilidad en toros (Farrell et al., 1998; Gillan et al., 2008; Shojaei et al., 2012; Oliveira et al., 2013; Nagy et al., 2015). De igual modo, Hallap et al., 2006, verificaron que existe relación entre algunos de los parámetros de movilidad registrados mediante el CASA (velocidad lineal, movilidad total, índice de linealidad y número de espermatozoides móviles) y la fertilidad en toros.

Además, ensayos en otras especies como cerdos, conejos y caballos han evidenciado correlaciones bajas y no significativas entre la fertilidad *in vivo* y los parámetros de movimiento espermático evaluados mediante el CASA (Quintero-Moreno et al., 2004; Quintero-Moreno et al., 2007), teniendo en cuenta que se debe destacar que se ha valorado el movimiento espermático conjuntamente con otros parámetros de calidad seminal como la viabilidad, la anomalías morfológicas y el test de resistencia osmótica. Lo que contrasta con los trabajos previamente citados, en los cuales se correlacionaron únicamente los parámetros de movimiento celular con la fertilidad, favoreciendo los valores obtenidos.

VIABILIDAD ESPERMÁTICA

La membrana plasmática del espermatozoide es esencial para la fecundación, una membrana plasmática intacta y funcional es clave para que el espermatozoide pueda sufrir los eventos de capacitación y reacción acrosomal oportuna, además de penetrar la zona pelucida del oocito, procesos que en conjunto determinan la capacidad fecundante de un espermatozoide (Jeyendran et al., 1984; Burks & Saling, 1992). Debido a su composición rica en ácidos grasos insaturados y a la interacción con múltiples estímulos externos, la membrana plasmática de los espermatozoides es el principal sitio donde ocurren las alteraciones cuando el semen es sometido al proceso de criopreservación (Hammerstedt et al., 1990; Krogenaes et al., 1994). La utilización de tinciones supravitales han permitido evaluar la viabilidad del espermatozoide mediante microscopía óptica convencional, a pesar de que uso se encuentra limitado a la evaluación del semen fresco dado que el glicerol y otros aditivos utilizados en el proceso de congelación del semen interfieren con la coloración. De otro lado, la concentración del colorante puede generar un efecto tóxico, lo cual podría sobreestimar el número de espermatozoides muertos (Woelders, 1991). Los colorantes más utilizados en el análisis seminal convencional son el Azul tripan (AT) o la combinación de la eosina con la nigrosina (EN), permitiendo observar la cabeza del espermatozoide muerto de color azul en el caso del AT o color violáceo o rosado en el caso de la EN, este hecho deriva de la inclusión del colorante al interior de la cabeza espermática debido a la permeabilidad de la membrana plasmática. El espermatozoide viable con la membrana plasmática íntegra, excluye el colorante y no presenta coloración; que en el caso de la EN se observa de color blanco al contrastar con el color del fondo de la lámina, que es teñida por la nigrosina (Swanson & Bearden, 1951). El uso de las tinciones supravitales para medir la vitalidad es cada día más limitado, no obstante, recientes investigaciones la han implementado para evaluar la viabilidad de pajuelas descongeladas y relacionarla con la fertilidad, encontrando relación favorable en un caso (Morado et al., 2015) y en otras experiencias no se demostró asociación (Brito et al., 2003; Sharma et al., 2016).

En la actualidad es común la implementación de sustancias fluorescentes de alta especificidad dentro del análisis seminal, en donde se utilizan moléculas que permiten valorar el estado de la membrana plasmática. Los colorantes más comunes son el SYBR-14 y el yoduro de propidio, rodamina 123, naranja de acridina y Hoescht 33342 (Gillan et al., 2005; Gil-Villa et al., 2009, 2010; Mayorga-Torres et al., 2013). El SYBR-14 tiñe el DNA de espermatozoides viables de color verde brillante, mientras que el yoduro de propidio penetra los espermatozoides no viables, tiñendo el DNA de color rojo brillante. La valoración porcentual entre espermatozoides viables y no viables se realiza mediante un microscopio de fluorescencia o aplicando la citometría de flujo (Gillan et al., 2005).

Adicionalmente, la integridad funcional de la membrana plasmática puede ser evaluada al someter los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, generando una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica intracelular con la del medio extracelular (Rota et al., 2000; Cardona Maya et al., 2007; Quintero-Moreno et al., 2011). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (Jeyendran et al., 1984), produciendo un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Jeyendran et al., 1984), debido a que se encuentra afectada la captación selectiva de agua para alcanzar un equilibrio pasivo entre los medios intra y extracelular. De esta manera, la prueba hiposmótica, genéricamente llamado HOST/HOS ha sido usado ampliamente y con gran efectividad para determinar la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides provenientes de pajillas descongeladas (Morado et al., 2015). Esta es una evaluación de bajo costo y que presenta correlación con otras técnicas más costosas, sin embargo al relacionar los resultados de tasas de fertilidad frente la integridad de membrana se presentan resultados favorables con grandes variaciones (Correa et al., 1997), o resultados desfavorables (Sharma et al., 2016). Brito et al., 2003, determinaron que la prueba hiposmótica aporta una información relevante al análisis seminal integral, ya que, es un predictor eficaz de la tasa de división, resultante del proceso de fertilización in vitro.

La OMS (WHO, 1999, 2010) recomienda utilizar conjuntamente la eosina y el test hiposmótico como herramientas básicas para el análisis seminal en humanos. La tinción con eosina determina la integridad de la membrana plasmática en la cabeza del espermatozoide y la prueba hiposmótica en el flagelo (Munuce et al., 2000). Recientemente se realizó una experiencia con semen de bovino criopreservado, correlacionando la fertilidad en finca con los valores obtenidos mediante la asociación entre los resultados aportados por la tinción con Eosina-nigrosina y la prueba hiposmótica, avalando el uso de la prueba como predictor del potencial reproductivo en toros ($r=0,49$, $p<0,01$) (Quintero Moreno et al., 2011).

MORFOLOGÍA

Desde hace tiempo se describió que una alta proporción de espermatozoides morfológicamente normales en el eyaculado está asociada con la fertilidad en toros (Saacke & White, 1972; Hammerstedt, 1996), pero la relación entre una morfología normal y la habilidad para fertilizar un oocito in vivo permanece incierta; incluso genera resultados controversiales en la evaluación "in vitro" (Mutembei et al., 2016) o "in vivo"

(Sharma et al., 2016). Utilizando la evaluación visual subjetiva mediante un operador calificado, varios estudios han señalado que solo una población de espermatozoides morfológicamente normal es capaz de penetrar el moco cervical (Hanson & Overstreet, 1981; Mortimer et al., 1982) y alcanzar el sitio de fertilización (Saacke & White, 1972); sin embargo, cuando se observa específicamente la morfología de la cabeza del espermatozoide parece que la selección espermática en función de un grupo de espermatozoides morfológicamente normal no ocurre en el moco cervical (Mortimer et al., 1982), aunado a esto, una gran proporción de espermatozoides con la cabeza morfológicamente anormal provenientes de un semen etiquetado como “normal” pueden ser encontrados en el sitio donde ocurre la fertilización (Ahlgren et al., 1973). De aquí deriva la aseveración que una evaluación satisfactoria de la morfología espermática en una muestra seminal podría no ser del todo eficaz. Contrariamente, estudios “in vitro” utilizando muestras seminales con más del 40% de espermatozoides normales demostraron que un número significativo de espermatozoides con morfología normal se vinculan a la zona pelúcida de los oocitos, mientras que la penetración de los espermatozoides con anomalías morfológicas ocurría, pero en menor cuantía, puntualizando que los que penetraban presentaban su anomalía en la cabeza (Liu & Baker, 1992), además, la proporción de espermatozoides con esta anomalía que se vincularon a la zona pelúcida era muy similar a la proporción valorada en la muestra seminal, previo a la inseminación. En referencia a la medición de la integridad del acrosoma, la mayoría de los investigadores avalan la importancia de este parámetro por su relación con la fertilidad “in vivo” o “in vitro”, hecho demostrable en trabajos recientes (Morado et al., 2015; Sharma et al., 2016).

Al evaluar la biometría de la cabeza espermática, Liu & Baker, 1992, observaron que el ancho y el área de la cabeza espermática fueron significativamente mayores en espermatozoides unidos a la zona pelúcida. Sin embargo, en un ensayo más reciente, donde se evaluó la fertilidad in vivo, se evidenció que el toro que tenía la mayor fertilidad, producía espermatozoides con dimensiones morfométricas menores a los toros con menor fertilidad (Rubio-Guillen et al., 2007). Sundström, 1984, investigando en semen de humanos evidenció que solo los espermatozoides con morfología normal podrían penetrar la zona pelúcida del oocito, en contraste, Sathananthan et al., 1986, observaron que los espermatozoides con cabezas anormales penetran la zona pelúcida con alta frecuencia. Años más tarde, Eggert-Kruse et al., 1995, aseveraron que aquellos espermatozoides que presentan cabezas amorfas suelen ser más anchos de lo normal y son incapaces de penetrar el moco cervical.

La Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) ha hecho grandes esfuerzos en determinar y homogenizar criterios en función de la biometría espermática en humanos. Sin embargo, al valorar las dimensiones espermáticas en otros mamíferos de especial interés en producción animal, no se observa homogeneidad en los criterios. En el caso del toro, las investigaciones son muy escasas y los resultados publicados son muy variados para intentar postular medidas estándar, aunado a esto, ensayos hechos hace más de 50 años reportan valores biométricos con coeficientes de variación muy bajos (3-5%) (Williams & Savage, 1925).

INTEGRIDAD DEL DNA

El espermatozoide contribuye para la formación de un nuevo individuo con el genoma paterno, RNAs, centriolo y probablemente más componentes importantes para el desarrollo embrionario (Vasco et al., 2008). En la última década diferentes estudios han demostrado la importancia de la integridad del DNA espermático en la fecundación y en las primeras etapas del desarrollo embrionario, siendo reconocida como un nuevo parámetro indicativo del potencial fecundante masculino (Agarwal & Said, 2003; Gil-Villa et al., 2009, 2010; Rodriguez et al., 2011), lo que ha generado en la comunidad científica la necesidad de implementar técnicas que evalúen la integridad del DNA espermático, en función del grado de fragmentación del mismo.

El espermatozoide maduro no posee mecanismos significativos de reparación del DNA (Hughes et al., 1997). Los daños pueden ocurrir a nivel: testicular, epididimal o post-eyaculatorio (Sundström, 1984) y las causas pueden estar relacionadas con fallas en el empaquetamiento, en la madurez nuclear, en fragmentación de la cromatina o por defectos en la integridad del DNA (Karabinus et al., 1997; Agarwal & Said, 2003; Lewis & Aitken, 2005; Walters et al., 2006). Algunos quiebres en el DNA son necesarios para reducir el estrés torsional experimentado por la doble hélice, cuando se generan reordenamientos en la transición de histonas por las protaminas en las espermátidas (McPherson & Longo, 1993). Sin embargo, si estos quiebres temporales no son reparados antes de completar la espermiogénesis pueden tener efectos deletéreos (Lewis & Aitken, 2005). Aun no es claro cómo se generan las anomalías de la cromatina y el daño del DNA en el espermatozoide.

Se han implementado diversas técnicas mediante las cuales es posible evaluar la integridad del DNA espermático, entre que las que se destacan: SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) (Evenson et al., 1999), TUNEL (Sun et al., 1997), OxyDNA (Shen & Ong, 2000), Halosperm (Martínez-Pastor et al., 2009) y el ensayo cometa (Boe-Hansen et al., 2005) con alta especificidad y sensibilidad, siendo indicadores directos o indirectos de una alteración. En el caso particular del análisis mediante SCSA (Evenson et al., 1999), en el cual los espermatozoides son

sometidos a un tratamiento con un detergente ácido y posteriormente son teñidos con el colorante naranja de acridina, un agente intercalante que emite fluorescencia verde al intercalarse en DNA de cadena doble y roja para el DNA de cadena sencilla. Los resultados son expresados por el índice de fragmentación de DNA (% DFI), relacionando la fluorescencia media roja sobre la fluorescencia total, el cual posee un buen valor pronóstico y diagnóstico respecto a infertilidad y éxito en ciclos de fertilización in-vitro (Evenson et al., 1999; Gil-Villa et al., 2009, 2010). Esta técnica ha sido ampliamente estudiada y ha demostrado ser altamente reproducible (Evenson et al., 2002; Schlegel & Paduch, 2005). Sin embargo, no todos los laboratorios tienen acceso a un citómetro de flujo y al personal técnico especializado necesario para el procesamiento y análisis, lo que representa una limitación para su inclusión dentro del análisis seminal convencional.

En bovinos, esta prueba se encuentra altamente correlacionada con la fertilidad (Ballachey et al., 1987; Ballachey et al., 1988; Januskauskas et al., 2001). En humanos, elevados niveles de fragmentación del DNA puede estar asociada a baja una movilidad y a alteración de la morfología espermática (Lopes et al., 1998; Zini et al., 2001); no obstante, se ha observado que también puede ser un parámetro independiente, donde una muestra puede estar clasificada dentro de los criterios normalidad, bajo los parámetros clásicos de movilidad, concentración y morfología espermática, y al mismo tiempo presentar DNA alterado, dando lugar a pérdidas espontáneas, embriones no viables, por lo que podría pasar como una infertilidad idiopática al pasar por desapercibido (Evenson et al., 1999).

INTERACCIÓN ENTRE ESPERMATOZOIDE Y EL OVIDUCTO

Un gran número de espermatozoides son eyaculados, y menos del 1% alcanza a llegar oviducto, por lo tanto, la selección, almacenamiento y regulación espermática se ven controlados por el tracto reproductivo femenino (Petrunkina et al., 2007; Hunter, 2008). Actualmente se conoce que la interacción que se establece entre el espermatozoide y el epitelio del oviducto estabiliza y prolonga la su movilidad y viabilidad (Petrunkina et al., 2007). Las proteínas del plasma seminal bovino adheridas al espermatozoide tienen un rol preponderante en la interacción que se establece con los receptores oviductales (Suarez, 2002). La interacción in vitro entre espermatozoides y cultivo oviductal presenta un alto potencial para predecir la tasa de fertilidad, pese a los amplios rangos de variación que presenta, lo cual arroja resultados que podrían generar una interpretación inexacta (Kastelic & Thundathil, 2008).

INTERACCIÓN ENTRE ESPERMATOZOIDE Y LA ZONA PELUCIDA

Varios procedimientos de fertilización y medición del desarrollo embrionario temprano han sido usados en la evaluación de la calidad seminal y que pueden suministrar información valiosa sobre la habilidad de fertilización que puede tener un toro en cuestión. La fertilización involucra varios eventos secuenciales, (1) capacitación espermática, (2) unión del espermatozoide capacitado a la zona pelucida, (3) inducción de la reacción acrosómica, (4) penetración de la zona pelucida y (5) fusión del espermatozoide a la membrana vitelina del oocito (Cardona Maya & Cadavid Jaramillo, 2004). De estos eventos, uno en especial es el reconocimiento e interacción entre la zona pelucida (ZP3) del oocito y el espermatozoide capacitado (Yanagimachi, 1994). Esta interacción promueve la reacción acrosómica, la cual propicia la interacción espermatozoide-oocito al interactuar la membrana acrosomal interna con una glicoproteína (ZP2), facilitando la unión del espermatozoide a la zona matriz durante la penetración (Yanagimachi, 1994; Aitken, 2006).

Esta interacción oocito-espermatozoide se viene utilizando desde hace mucho tiempo como mecanismo de predicción de la fertilidad en toros y en otras especies. Los resultados de la fertilización in vitro difieren entre toros (Morado et al., 2015) y tal diferencia podría estar relacionada al número relativo de espermatozoides que interactúan y se ligan a los oocitos (Fazeli et al., 1993). Un gran número de oocitos son necesarios para realizar este test y las diferencias encontradas entre los toros solo son detectables si ellos exceden tal proporción entre los oocitos (Zhang et al., 2008). Algunos estudios han encontrado correlaciones significativas entre la división embrionaria y la fertilidad en campo (Shamsuddin & Larsson, 1993; Morado et al., 2015), a pesar de que existen trabajos que contrastan estos resultados (Schneider et al., 1996), donde la relación entre oocitos fertilizados y la fertilidad in vivo ha sido también variable (Bredbacka et al., 1997; Zhang et al., 1997). La fertilización basada en la proporción de división del cigoto fue altamente correlacionada con la tasa de no retorno; a pesar de que los resultados basados en la producción de blastocistos presenta una variabilidad considerable (Zhang et al., 1997). El test de penetración ha sido usado para predecir la fertilidad in vivo (Puglisi et al., 2004), sin embargo, la penetración de los espermatozoides varía en función de la proporción espermatozoides-oocitos en el medio, duración de la incubación y las concentraciones de heparina, limitando la significancia de este test para predecir fertilidad (Kastelic & Thundathil, 2008).

CONCLUSIONES

Muchos esfuerzos se han hecho en torno a indagar como las técnicas de evaluación de la calidad seminal podrían predecir la fertilidad, además de mejorar las tasas de fecundación en toros, un campo en el que necesita nuevas aproximaciones. Actualmente, nuevas técnicas de evaluación seminal se empiezan a desarrollar e implementar para describir la calidad de una muestra, no obstante, aún no podemos realizar aseveraciones sobre el potencial de fertilidad de la misma. Cada una de estas herramientas descriptivas permitirá mejorar la precisión frente nuevos parámetros seminales que posiblemente se encuentren relacionados con la capacidad de fecundar un oocito. Lo que sí es un hecho es que estos avances en la evaluación seminal podrían propiciar resultados alentadores en un futuro no muy lejano.

REFERENCIAS

- Agarwal A, & Said, TM. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update** 9(4): 331-345.
- Ahlgren M, Bostrom, K, & Malmquist, R. 1973. Sperm transport and survival in women with special reference to the Fallopian tube. **INSERM Colloque**26: 183-200.
- Aitken RJ. 2006. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology** 29(1): 69-75; discussion 105-108.
- Ballachey BE, Evenson, DP, & Saacke, RG. 1988. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology** 9(2): 109-115.
- Ballachey BE, Hohenboken, WD, & Evenson, DP. 1987. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of Reproduction** 36(4): 915-925.
- Boe-Hansen GB, Morris, ID, Ersboll, AK, Greve, T, & Christensen, P. 2005. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology** 63(6): 1789-1802.
- Bredbacka K, Andersson, M, & Bredbacka, P. 1997. The use of in vitro fertilization and sperm assay to evaluate field fertility of bulls. **Theriogenology**, 47(1): 253-253.
- Brito LFC, Barth, AD, Bilodeau-Goeseels, S, Panich, PL, & Kastelic, JP. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology** 60(8): 1539-1551.
- Burks DJ, & Saling, PM. 1992. Molecular Mechanisms of Fertilization and Activation of Development. **Animal Reproduction Science** 28(1-4): 79-86.
- Cardona Maya WD, Berdugo Gutierrez, JA, de los Rios, J, & Cadavid Jaramillo, AP. 2007. Functional evaluation of sperm in Colombian fertile men. **Archivos Españoles de Urología** 60(7): 827-831.
- Cardona Maya WD, & Cadavid Jaramillo, AP. 2004. Complementariedad intergametos: breve revisión. **Archivos Españoles de Urología** 57(10): 1107-1112.
- Correa JR, Pace, MM, & Zavos, PM. 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology** 48(5): 721-731.
- Eggert-Kruse W, Reimann-Andersen, J, Rohr, G, Pohl, S, Tilgen, W, & Runnebaum, B. 1995. Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm-mucus interaction in vivo and in vitro. **Fertility and Sterility** 63(3): 612.
- Evenson DP, Jost, LK, Marshall, D, Zinaman, MJ, Clegg, E, Purvis, K, de Angelis, P, & Claussen, OP. 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction** 14(4): 1039-1049.
- Evenson DP, Larson, KL, & Jost, LK. 2002. Sperm chromatin structure assay: Its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology** 23(1): 25-43.
- Farrell PB, Presicce, GA, Brockett, CC, & Foote, RH. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology** 49(4): 871-879.
- Fazeli AR, Steenweg, W, Bevers, MM, de Loos, FA, van den Broek, J, & Colenbrander, B. 1993. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. **Veterinary Record** 132(1): 14-16.
- Gil-Villa AM, Cardona-Maya, W, Agarwal, A, Sharma, R, & Cadavid, A. 2009. Role of male factor in early recurrent embryo loss: do antioxidants have any effect? **Fertility and Sterility** 92(2): 565-571.
- Gil-Villa AM, Cardona-Maya, W, Agarwal, A, Sharma, R, & Cadavid, A. 2010. Assessment of sperm factors possibly involved in early recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility** 94(4): 1465-1472.
- Gillan L, Evans, G, & Maxwell, WM. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, 63(2): 445-457.
- Gillan L, Kroetsch, T, Maxwell, WM, & Evans, G. 2008. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science** 103(3-4): 201-214.
- Hallap T, Jaakma, U, & Rodriguez-Martinez, H. 2006. Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. **Reproduction in Domestic Animals** 41(3): 214-218.
- Hammerstedt RH. 1996. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. **Animal Reproduction Science** 42(1-4): 77-87.
- Hammerstedt RH, Graham, JK, & Nolan, JP. 1990. Cryopreservation of Mammalian Sperm - What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology** 11(1): 73-88.

- Hanson FW, & Overstreet, JW. 1981. The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** 140(2): 173-178.
- Hughes CM, Lewis, SEM, McKelveyMartin, VJ, & Thompson, W. 1997. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 374(2): 261-268.
- Hunter R. 2008. Sperm release from oviduct epithelial binding is controlled hormonally by peri-ovulatory graafian follicles. **Molecular reproduction and development**, 75(1): 167-174.
- Januskauskas A, Johannisson, A, & Rodriguez-Martinez, H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, 55(4): 947-961.
- Jeyendran RS, Van der Ven, HH, Perez-Pelaez, M, Crabo, BG, & Zaneveld, LJ. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility** 70(1): 219-228.
- Karabinus DS, Vogler, CJ, Saacke, RG, & Evenson, DP. 1997. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology** 18(5): 549-555.
- Kastelic JP, & Thundathil, JC. 2008. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 43 Suppl 2: 368-373.
- Krognaes A, Andersen Berg, K, Hafne, AL, & Engeland, E. 1994. Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. **Acta Veterinaria Scandinavica** 35(1): 17-26.
- Lewis SEM, & Aitken, RJ. 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, 322(1): 33-41.
- Liu D, & Baker, H. 1992. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 94(1): 71-84.
- Lopes S, Jurisicova, A, Sun, JG, & Casper, RF. 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, 13(4): 896-900.
- Martínez-Pastor F, Del Rocío Fernández-Santos, M, Domínguez-Rebollo, Á, Esteso, M, & Garde, J. 2009. DNA status on thawed semen from fighting bull: a comparison between the SCD and the SCSA tests. **Reproduction in Domestic Animals** 44(3): 424-431.
- Mayorga-Torres BJ, Cardona-Maya, W, Cadavid, A, & Camargo, M. 2013. Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. **Actas Urológicas Españolas** 37(4): 221-227.
- McPherson SM, & Longo, FJ. 1993. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. **Development Biology** 158(1): 122-130.
- Morado S, Pereyra V, Breininger E, Sara R, Cetica P. 2015. Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility. **Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry** 2(1): 1005-1008.
- Mortimer D, Leslie, EE, Kelly, RW, & Templeton, AA. 1982. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility** 64(2): 391-399.
- Munuce M, Caille, A, Berta, C, Perfumo, P, & Morisoli, L. 2000. Does the hypoosmotic swelling test predict human sperm viability? **Systems Biology in Reproductive Medicine** 44(3): 207-212.
- Munuce MJ, Cardona-Maya, W, & Berta, CL. 2006. Existe asociación entre la morfología normal del espermatozoide y su cinética de desplazamiento? **Actas Urológicas Españolas** 30(6): 591-597.
- Mutembei HM, Origa R, Agumbah GJO. 2016. An In-Vitro criterion for comparative assessment of fertility characteristics of bull semen in Kenya. **Journal of Agriculture Science Food Technology** 2(6): 100-104.
- Nagy A, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S. 2015. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer - assisted semen analysis. **Acta Veterinaria Hungarica** 63 (3): 370-381.
- Oliveira LZ, de Arruda, RP, de Andrade, AFC, Celeghini, ECC, Reeb, PD, Martins, JPN, dos Santos, RM, Beletti, ME, Peres, RFG, Monteiro, FM, & de Lima, VFMH. 2013. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science** 137(3-4): 145-155.
- Petrunkina AM, Waberski, D, Gunzel-Apel, AR, & Topfer-Petersen, E. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. **Reproduction** 134(1): 3-17.
- Puglisi R, Balduzzi, D, & Galli, A. 2004. In vitro sperm penetration speed and its relationship with in vivo bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals** 39(6): 424-428.
- Quintero-Moreno A, Rubio Guillén, J, González Villalobos, D, Gutiérrez, JC, Madrid Bury, N, & López-Brea, JG. 2011. Identification of cryodamage on plasma membrane integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. **Revista Científica, FCV-LUZ XXI** (5): 403-407.
- Quintero-Moreno A, Rigau, T, & Rodríguez-Gil, JE. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology** 61(4): 673-690.
- Quintero-Moreno A, Rigau, T, & Rodríguez-Gil, J. 2007. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. **Reproduction in Domestic Animals** 42(3): 312-319.
- Rodríguez E, Gil-Villa, AM, Aguirre-Acevedo, DC, Cardona-Maya, W, & Cadavid, AP. 2011. Evaluación de parámetros seminales no convencionales en individuos cuyas parejas presentan muerte embrionaria temprana recurrente: en busca de un valor de referencia. **Biomedica** 31(1): 100-107.
- Rota A, Penzo, N, Vincenti, L, & Mantovani, R. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology** 53(7): 1415-1420.
- Rubio-Guillen J, Gonzalez, D, Garde, JJ, Esteso, MC, Fernandez-Santos, MR, Rodríguez-Gil, JE, Madrid-Bury, N, & Quintero-Moreno, A. 2007. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. **Reproduction in Domestic Animals** 42(4): 354-357.

- Saacke R, & White, J. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. Paper presented at the Proceeding 4th Tech. Conf. on AI and Reprod., NAAB.
- Sathananthan AH, Trounson A, & Wood C. 1986. Atlas of fine structure of human sperm penetration, eggs, and embryos cultured in vitro. Praeger Scientific, Philadelphia. 279 p.
- Schlegel PN, & Paduch, DA. 2005. Yet another test of sperm chromatin structure. **Fertility and Sterility** 84(4): 854-859.
- Schneider C, Ellington, J, & Wright, R. 1996. Effects of bulls with different field fertility on in vitro embryo cleavage and development using sperm co-culture systems. **Theriogenology** 45(1): 262-262.
- Shamsuddin M, & Larsson, B. 1993. In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. **Reproduction in Domestic Animals** 28(2): 77-84.
- Sharma M, Singh M, Sharma A & Kumar P. 2016. Correlation between semen evaluation parameters and fertility of frozen-thawed semen of jersey x local hill cattle crossbred bulls. **Indian Journal of Animal Reproduction** 37(1): 52-54.
- Shen H, & Ong, C. 2000. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. **Free Radical Biology & Medicine** 28(4): 529-536.
- Shojaei H, Kroetsch, T, Wilde, R, Blondin, P, Kastelic, JP, & Thundathil, JC. 2012. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. **Theriogenology** 77(5): 940-951.
- Suarez SS. 2002. Formation of a reservoir of sperm in the oviduct. **Reproduction in Domestic Animals** 37(3): 140-143.
- Sun JG, Jurisicova, A, & Casper, RF. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biology of Reproduction** 56(3): 602-607.
- Sundström P. 1984. Interaction between human gametes in vitro: a scanning electron microscopic study. **Systems Biology in Reproductive Medicine** 13(1): 77-85.
- Swanson EW, & Bearden, H. 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science** 10(4): 981-987.
- Vasco GC, Gil Villa, AM, Piedrahita Ochoa, C, Cardona Maya, W, & Cadavid Jaramillo, A. 2008. Influencia de la impronta genómica masculina en la reproducción. **Actas Urológicas Españolas** 32(10): 1004-1012.
- Walters AH, Saacke, RG, Pearson, RE, & Gwazdauskas, FC. 2006. Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. **Theriogenology** 65(6): 1016-1028.
- WHO. 1999. **WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction**. 4th ed. World Health Organization. Cambridge. University press. 128 p.
- WHO. 2010. **WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen**: 5th ed. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 271 p.
- Williams W, & Savage, A. 1925. Observations on the seminal micropathology of bulls. **Cornell Vet** 15(353): 75.
- Woelders H. 1991. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. **Boar semen preservation II**. Ed. Johnson LA, Rath, D. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg: 145-164.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: **The physiology of reproduction**. E Knobil, J.D Neill (Eds.) Raven Press, New York, NY, USA, pp. 189-317.
- Zhang B, Larsson, B, & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2008. Influence of batches of bovine oocytes on the outcome of an intact zona pellucida binding assay and in vitro fertilization. **International Journal of Andrology** 18(4): 213-220.
- Zhang BR, Larsson, B, Lundeheim, N, & RodriguezMartinez, H. 1997. Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology** 48(2): 221-231.
- Zini A, Bielecki, R, Phang, D, & Zenzes, MT. 2001. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility** 75(4): 674-677.