

Características del semen de relevancia para la Inseminación Artificial a Tiempo Fijo

J. C. Dalton ⁽¹⁾

Resumen

Los productores de ganado bovino de razas de carne y de leche que utilizan IATF están interesados en identificar los toros más fértiles. Lamentablemente, aunque los investigadores y los clínicos han intentado durante décadas desarrollar técnicas para predecir con precisión la fertilidad de una muestra de semen, el objetivo no se ha alcanzado. A pesar de la variedad de herramientas disponibles en la actualidad para evaluar el semen y estimar la fertilidad relativa, esta actividad sigue siendo una ciencia imperfecta.

Así que, ¿cuáles son las características del semen que son relevantes para inseminación artificial? En la práctica, todos los productores deben:

- Comprar semen de centros de IA reconocidos, ya que se sabe que el procesamiento del semen para la criopreservación puede influir en la fertilidad, tal como se determina por el porcentaje de motilidad y acrosomas intactos después de la descongelación.

- Minimizar el riesgo asociado a deficiencias seminales no compensables utilizando semen de centros de IA en los cuales la determinación de la morfología espermática es una parte rutinaria del proceso de evaluación, permitiendo así identificar los toros con problemas.

Además, es importante reconocer que la IATF puede magnificar las diferencias en la fertilidad del toro a medida que el intervalo de tiempo desde la IA a la ovulación aumenta.

Podría esperarse que la magnitud de las diferencias en fertilidad entre toros se minimice cuando el protocolo de sincronización controla con precisión el momento de la IATF en relación con el momento de la ovulación.

La IA debería ocurrir lo suficientemente cerca de la ovulación como para maximizar el acceso de los espermatozoides al ovocito, pero no demasiado tarde como para tener un ovocito envejecido esperando la llegada del espermatozoide al sitio de la fertilización en el oviducto.

La identificación de toros AAF (antígeno asociado a la fertilidad) positivos y negativos no tuvo éxito como método para evaluar la fertilidad potencial de los toros que se utilizarán en la IATF.

Introducción

Los productores de ganado bovino de razas de carne y de leche que utilizan los programas de IA a tiempo fijo (IATF) en cualquier parte del mundo están interesados en la identificación de los toros más fértiles para la IATF. Amann y Hammerstedt ⁽³⁾

argumentan que si bien los investigadores y los clínicos han intentado durante décadas "desarrollar técnicas para predecir con precisión la fertilidad de una muestra de semen de un macho individual, el objetivo no se ha logrado". Lamentablemente, en 2013, esta afirmación sigue siendo cierta.

(1) Profesor y especialista en extensión en ganado lechero. Universidad de Idaho, Caldwell, Idaho, EE.UU.
Conferencia dictada en el X Simposio Internacional de Reproducción Animal (IRAC), Córdoba, 4 al 6 de julio de 2013.

Actualmente se conocen *algunos* de los atributos del semen que son necesarios para la fertilización (Tabla 1), pero otros siguen siendo desconocidos. Para complicar la situación, tal como describe Rodríguez-Martínez ⁽⁴²⁾, "la eyaculación en los toros es heterogénea, y no todos los espermatozoides tienen todos los atributos necesarios para la fertilización". Además, los atributos necesarios para la fertilización sin duda varían si se utiliza servicio natural o IA (incluso, en función del sitio de descarga del semen), si se utiliza la sincronización de la ovulación e IATF, y de factores dependientes de la hembra.

Tabla 1. Atributos del espermatozoide necesarios para la fertilización.^(*)

Morfología "aceptable"
Metabolismo para la producción de energía
Motilidad progresiva
Capacidad de motilidad hiperactiva
Estabilización del plasma y los lípidos de la membrana acrosómica
Enzimas acrosómicas
Integridad de la cromatina

(*) Lista parcial adaptada de Amann y Hammerstedt ⁽³⁾.

¿Qué características del semen son relevantes para la IATF? Probablemente sean relevantes numerosas características conocidas y desconocidas, sin embargo, limitaremos la discusión a 1) la calidad del semen, tanto rasgos compensables y no compensables, 2) el antígeno asociado a la fertilidad, y 3) la fertilidad del toro y momento de la IA en relación con la ovulación.

La calidad del semen y las barreras para el transporte espermático

La población de espermatozoides que llega al sitio de la fertilización (oviducto en la unión istmo-ampular) se encuentra más enriquecida en cuanto a viabilidad y morfología normal que los espermatozoides inseminados ⁽⁴¹⁾. A pesar de que los espermatozoides morfológicamente anormales se han asociado con subfertilidad y esterilidad durante muchos años ^(33, 58, 59), ahora se sabe que los espermatozoides con cabezas clásicamente deformes no atraviesan las barreras del aparato reproductor femenino ni participan en la fertilización en base a los datos sobre los espermatozoides accesorios obtenidos de los óvulos y los embriones ⁽⁴⁶⁾.

Las barreras conocidas al transporte de los espermatozoides en la vaca incluyen el complejo cérvix-tapón mucoso ⁽³⁷⁾ y el útero ⁽³⁶⁾. Numerosos investigadores han dilucidado la relación entre las barreras para el transporte de espermatozoides y anomalías morfológicas específicas. En la vaca, el complejo cérvix-tapón mucoso es una barrera para colas y cabezas anormales ⁽³¹⁾. La zona pelúcida del óvulo, sin embargo, puede ser la barrera más formidable para la participación en la fertilización de espermatozoides viables morfológicamente anormales ⁽²²⁾. Además, se ha informado que los espermatozoides con acrosomas anormales tienen deteriorada su capacidad para unirse al óvulo *in vitro* y fracasan al intentar penetrar en la zona pelúcida ⁽⁵⁴⁾. Por último, se determinó que espermatozoides aparentemente normales, con un alto porcentaje de acrosomas anormales, son deficientes y que el desarrollo embrionario posterior a la fertilización con semen aparentemente normal, también se vio afectado ⁽⁵⁴⁾.

Setchell y col. ⁽⁵¹⁾ informaron sobre la evidencia de una relación entre la reducción del desarrollo embrionario y espermatozoides con morfología aparentemente normal en un eyaculado de ratón. El rendimiento reproductivo alterado de semen aparentemente normal en un eyaculado anormal de toros y ratones ^(51, 54) proporciona evidencia alarmante de que la "morfología normal" puede ser similar a la parte visible de un iceberg que perjudica la reproducción.

La calidad del semen

Brevemente, las deficiencias en la calidad del semen se pueden clasificar en dos categorías: "compensables" y "no compensables" ⁽⁴⁵⁾. Los rasgos compensables de la calidad del semen se refieren a la capacidad de los espermatozoides inseminados no sólo para alcanzar el ovocito, sino también para ligarse a él y penetrar la zona pelúcida, e iniciar el bloqueo de la polispermia. Las deficiencias del semen que se pueden superar o minimizar mediante el aumento de la dosis de espermatozoides se consideran compensables. Los centros serios de IA ajustan la dosis para IA en forma habitual cuando se conocen las deficiencias compensables.

Los rasgos no compensables de la calidad del semen se relacionan con la competencia de los espermatozoides fertilizantes para completar el proceso de fertilización y mantener el desarrollo

embrionario temprano. Las deficiencias del semen que dan como resultado una supresión de la fertilidad sea cual fuere la dosis de espermatozoides son consideradas no compensables. Los toros con semen que presenta niveles inaceptables de espermatozoides anormales suelen ser la principal fuente de rasgos no compensables. Los centros serios de IA, sin embargo, no procesarán semen con niveles inaceptables de espermatozoides anormales. En la práctica, el impacto de las características seminales no compensables puede ser alto cuando se utilizan toros con servicio natural que no han sido sometidos a una evaluación reproductiva y cuando se utiliza semen recolectado a campo e instalaciones de congelación no acreditadas.

Se han relacionado los espermatozoides con morfología microscópica normal, pero con cromatina defectuosa, con casos de subfertilidad en el macho durante más de 40 años⁽¹⁸⁾, y es probable que éste sea un rasgo seminal no compensable⁽⁴⁰⁾. Evenson y col.⁽¹⁷⁾ desarrollaron una prueba para determinar la estructura de la cromatina. Revelaron una fuerte asociación positiva entre la fertilidad heterospermica en toros (sobre la base de marcadores genéticos al nacimiento) y la estabilidad del ADN del espermatozoide a la desnaturalización con ácido^(4, 29). Utilizando esta misma prueba y semen criopreservado en un estudio en el que los toros recibieron una agresión térmica (48-h aislamiento escrotal; 55), Karabinus y col.⁽²⁸⁾ informaron que el semen eyaculado antes del aislamiento escrotal tenía ADN más estable que el esperma eyaculado después del aislamiento escrotal (en el cual también era evidente la presencia de espermatozoides anormales). Acevedo y col.⁽¹⁾ también usaron una injuria escrotal durante 48 horas en toros Holando y modificaron la estructura de la cromatina, de modo que la estabilidad del ADN de los espermatozoides frente a la desnaturalización ácida podía ser evaluada en el mismo esperma que se analizaba morfológicamente. Acevedo y col.⁽¹⁾ informaron que la vulnerabilidad del ADN del espermatozoide a la desnaturalización ácida se encuentra asociada positivamente con espermatozoides de forma anormal y se extiende también a espermatozoides con forma normal en muestras anormales. Beletti y col.⁽⁵⁾ utilizaron el análisis de imágenes de computación de frotis de espermatozoides teñidos con azul de toluidina e informaron que los espermatozoides

con anomalías en la cromatina no necesariamente tienen morfología anormal de la cabeza del espermatozoide. En conjunto, estos resultados proporcionan evidencia de que el daño a la integridad de la cromatina se extiende más allá de la morfología espermática anormal y alcanza a los espermatozoides con morfología aparentemente normal. Aunque la selección del esperma por parte de la hembra parece fuerte, según la forma y motilidad de los espermatozoides, es evidente que no se produce la exclusión total de acceso al ovocito de espermatozoides incompetentes.

¿Cómo podría la estabilidad de la cromatina afectar la fertilidad? Sakkas y col.^(48, 49) especularon que defectos durante el empaquetado del ADN y la condensación de la cromatina de los espermatozoides durante la espermiogénesis darían como resultado la inestabilidad del ADN en los hombres subfértiles. Específicamente, se cree que las limitaciones en los puentes disulfuro esenciales para la condensación del ADN en el núcleo del espermatozoide son la fuente de la inestabilidad. La misma condensación del ADN que se produce en el testículo durante la espermatogénesis debe revertirse (es decir, descondensación) en el óvulo después de la fertilización, dando como resultado la restauración del ADN 2N del embrión.

La descondensación del núcleo del espermatozoide y el desarrollo del pronúcleo masculino debe producirse de una manera oportuna para que el embrión se desarrolle y genere una señal para el reconocimiento materno de la preñez. Walters y col.⁽⁵⁶⁾ compararon el desarrollo pronuclear después de FIV en semen recogido antes y después del aislamiento escrotal en toros *Bos taurus*, y concluyeron que la maduración normal de los espermatozoides es interrumpida durante el aislamiento escrotal, como lo demuestra la falta de descondensación después de la penetración del ovocito. Los resultados de Walters y col.⁽⁵⁶⁾ confirman los resultados anteriores de Eid y col.⁽¹⁴⁾ que observaron que las tasas de clivaje tempranas *in vitro* estaban reducidas debido a formación retardada del pronúcleo cuando se usaba semen de toros de baja fertilidad. En conjunto, parece que el factor limitante aparente es la descondensación del núcleo del espermatozoide. Por último, tal como informaron Walters y col.⁽⁵⁶⁾, el impacto del espermatozoide morfológicamente anormal se produjo antes del clivaje durante las primeras eta-

pas de la fertilización. Por lo tanto, la alteración de la estabilidad de la cromatina se considera un rasgo seminal no compensable, y ciertamente digna de investigación futura.

En contraste con la discusión anterior de espermatozoides con morfología microscópica normal, los espermatozoides muy deformados no aparecen como espermatozoides accesorios⁽⁴⁶⁾, y por lo tanto se cree que no son capaces de atravesar las barreras del tracto reproductivo femenino. En consecuencia, la presencia de espermatozoides muy deformados en una muestra de semen normal en otros aspectos, se considera un rasgo seminal compensable. La alteración progresiva de la motilidad del espermatozoide puede ser una de las razones para la exclusión de estos espermatozoides, tal como informaron Dresdner y Katz⁽¹²⁾, que comprobaron que incluso pequeñas diferencias geométricas en la morfología de la cabeza de los espermatozoides pueden causar grandes diferencias en la motilidad del espermatozoide.

Los rasgos seminales compensables no pueden explicarse completamente en base a la morfología y las mediciones actuales de viabilidad *in vitro*. Los toros cuyos espermatozoides sean capaces de acceder al ovocito *in vivo* en una dosis baja de inseminación en base a datos de la fertilidad⁽¹³⁾ o el número de espermatozoides accesorios por embrión (óvulos)⁽³⁸⁾ pueden diferir del semen de otros toros en cuanto a los patrones de motilidad espermática o modificaciones superficiales de los espermatozoides importantes para el reconocimiento de los ovocitos, la unión y la penetración. Por ejemplo, se cree que la motilidad hiperactivada es crítica para la fertilización exitosa, ya que permite a los espermatozoides desprenderse del epitelio del oviducto después de la colonización del istmo y penetrar con eficacia la zona pelúcida del ovocito^(20, 52). Además, Killian y col.⁽³⁰⁾ informaron que las modificaciones en la superficie de los espermatozoides pueden involucrar proteínas del plasma seminal, mientras Bellin y col.⁽⁷⁾ determinaron que las proteínas que se ligan a la heparina en las membranas de los espermatozoides y el líquido seminal estaban positivamente relacionadas con la fertilidad de los toros. (Una proteína específica que se liga a la heparina, llamada antígeno asociado a la fertilidad, se analizará en mayor detalle más adelante).

Aunque el reconocimiento de rasgos semina-

les, tanto compensables como no compensables, es importante, debemos concentrarnos en los rasgos no compensables, ya que provocan depresión de la fertilidad sea cual fuere el número de espermatozoides que se inseminen. Los productores pueden minimizar el riesgo asociado a deficiencias seminales no compensables utilizando semen para IA de centros en los cuales la determinación de la morfología de los espermatozoides es una parte rutinaria del proceso de evaluación, logrando así identificar los toros con problemas. Por último, en la caracterización del espermatozoide en base a la morfología a través de análisis de imagen de computadora, las diferencias morfológicas de los espermatozoides de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* deben ser consideradas a fin de evitar que las variaciones entre subespecies se puedan confundir con anomalías⁽⁶⁾.

Antígeno asociado a la fertilidad

Durante la eyaculación, las vesículas seminales, la próstata y las glándulas de Cowper secretan proteínas que se ligan a la heparina (HBP) que recubren los espermatozoides^(35, 39). En 1994, Bellin y col.⁽⁷⁾ informaron que la distribución de las formas específicas de HBP sobre el espermatozoide correspondía al potencial de fertilidad de los toros destinados a la monta natural. Desde entonces se han descrito diferentes patrones de HBP sobre el semen bovino^(8, 9).

Los toros con semen que exhibió antígeno asociado a la fertilidad (AAF), una proteína de peso molecular de 31 kDa, fueron 9 a 40 puntos porcentuales más fértiles (después del servicio natural) que los toros productores de espermatozoides que carecían de antígeno asociado a la fertilidad^(8, 9). Sprott y col.⁽⁵²⁾ utilizaron 25 toros de razas mezcladas, incluso *Bos taurus*, *Bos taurus* x *Bos indicus* y *Bos indicus* (Brahman) para investigar si el antígeno asociado a la fertilidad (AAF) podría ser utilizado para evaluar el potencial de fertilidad del semen para ser utilizado en IA. Los toros con semen que era AAF positivo tenían entre 7 y 9 puntos porcentuales más de fertilidad luego de un primer servicio por IA que los toros que producían espermatozoides sin AAF⁽⁵²⁾. Tomados en conjunto, los resultados de Bellin y col.^(8, 9) y Sprott y col.⁽⁵²⁾ proporcionaron evidencia de que el AAF parecía ser un rasgo importante del semen que se puede utilizar en la evaluación de su fertilidad potencial.

Así que, ¿qué proporción de los toros puede esperarse que sean AAF negativos? En 1998, Bellin y col.⁽⁹⁾ informaron que, en promedio, el 12% de los toros analizados (total probado= 2.191) en los Estados Unidos eran AAF negativos (rango= 0 a 50%, n= 44 rodeos).

Para investigar si la presencia de AAF podría utilizarse para evaluar la fertilidad potencial de los toros que se usarán para IATF, realizaron una investigación en colaboración la Universidad de Idaho (Caldwell, ID, EE.UU.), UNESP-Botucatu, (Sao Paulo, Brasil) y Alta Genetics (Uberaba, Minas Gerais, Brazil). Los objetivos de la investigación fueron determinar: 1) la frecuencia de la condición AAF positivo o AAF negativo entre toros Nelore (*Bos indicus*), y 2) si la AAF se puede utilizar para evaluar el potencial de fertilidad de los espermatozoides para ser utilizados en un primer servicio de IATF.

Para lograr el primer objetivo, se recolectaron eyaculados de toros Nelore (n=49, rango de edad: 2 años 8 meses a 11 años) alojados en Alta Genetics Brasil mediante vagina artificial. Inmediatamente después de recogido, 2,0 ml de semen puro se retiraron del vial de recolección

para su uso en un casete de flujo lateral (ReproTest, Midland Bioproducts Corporation, Boone, IA, EE.UU.) que facilitó la determinación rápida de la AAF. Se realizaron cincuenta ensayos con eyaculados de 49 toros. Cuarenta y siete pruebas (en eyaculados de 47 toros), dieron una clara determinación de la condición en cuanto al AAF, mientras que tres pruebas realizadas con eyaculados de dos toros fueron no concluyentes. Cinco toros (10,6%, 5/47) fueron AAF negativos, mientras que 42 toros (89,4%, 42/47) fueron AAF positivos⁽¹¹⁾. En consecuencia, parece que la condición de presencia o ausencia de AAF en toros Nelore (*Bos indicus*) es similar a lo visto para toros *Bos taurus* y *Bos taurus* x *Bos indicus* tal como informaron anteriormente Bellin y col.⁽⁹⁾

Después de la determinación de la condición AAF, seis toros Nelore (4 a 7 años de edad) fueron seleccionados en base a su condición AAF (AAF negativos: n= 3; AAF positivos: n= 3) y la capacidad de producir esperma ordenado, con características de esperma morfológicamente normal iguales o mayores al 70% y 60% motilidad progresiva estimada antes de la crioconservación. Los eyaculados fueron recogidos por vagina artifi-

cial, extendidos, empaquetados y criopreservados en pajuelas de 0,25 ml (dosis final: 30×10^6 espermatozoides).

Para lograr el segundo objetivo, se realizaron dos experimentos. El primer experimento se realizó en un establecimiento de ganado vacuno comercial en Mato Grosso do Sul, Brasil. Vacas Nelore multíparas en lactación ($n = 835$; 40 a 60 d después del parto) se evaluaron para determinar condición corporal (CC; escala 1-5; 21) y se incluyeron en un programa de IATF para el primer servicio. En el día 0, las vacas comenzaron el protocolo de sincronización con la inserción de un dispositivo de progesterona intravaginal (CIDR) + una inyección de benzoato de estradiol. En el día 9, el CIDR se retiró, se administraron cipionato de estradiol y $\text{PGF}_2\alpha$, y se quitaron los terneros durante 48 hs hasta la IATF. Dos técnicos realizan la IA, cada técnico usó semen de un toro. La preñez fue diagnosticada por ecografía transrectal 28 a 35 días después de la IATF.

La fertilidad, medida en base a preñez por IATF (P/IATF), no fue diferente entre los toros AAF positivos y los toros AAF negativos (41,5% vs. 39,3%, respectivamente; ¹¹). Hubo un efecto de técnico inseminador sobre la P/IATF (36,0% vs. 43,9%; $n = 375$ y $n = 460$, respectivamente; ¹¹). Se han informado previamente diferencias significativas entre los técnicos de IA (^{10, 50}) y pueden estar relacionados con el manejo del semen y el sitio de deposición del semen. La condición corporal tendió a afectar al cociente P/IATF, ya que las vacas con $\text{CC} \geq 2,75$ eran 1,4 veces más propensas a quedar preñadas al primer servicio IATF en comparación con las vacas con $\text{CC} < 2,75$. Además, las vacas con $\text{CC} < 2,75$ lograron un P/IATF ocho puntos porcentuales menor que las vacas con $\text{CC} \geq 2,75$, (38% vs. 46%, respectivamente; ¹¹). El impacto de un bajo puntaje de condición corporal sobre la fertilidad está de acuerdo con un informe anterior para ganado similar en Brasil (⁴⁷).

En el segundo experimento, vaquillonas nulpáparas Nelore ($n = 617$; 24-28 meses de edad, 300-340 kg de peso corporal) en un rancho de ganado comercial en Mato Grosso, Brasil fueron evaluadas para determinar su puntaje de condición corporal (CC) (como se describió anteriormente para las vacas multíparas) e incorporadas

en un programa de IATF al primer servicio. En el día 0, las vaquillonas comenzaron el protocolo de sincronización con un dispositivo intravaginal (CIDR) de segundo uso (utilizado anteriormente 9-d) + una inyección de benzoato de estradiol. En el día 7, todas las vaquillonas fueron tratadas con $\text{PGF}_2\alpha$. En el día 9, los dispositivos CIDR fueron retirados y todas las vaquillonas fueron tratadas con cipionato de estradiol y gonadotropina coriónica equina. En el día 11, todas las vaquillonas recibieron IATF 48 h después de retiro del dispositivo de progesterona (CIDR). Dos técnicos realizaron la IA, cada técnico usó semen de un toro. La preñez fue diagnosticada por ecografía transrectal 28 a 35 días después de la IATF. Aunque la fertilidad (P/IATF) fue distinta entre los toros AAF positivos y los AAF negativos (33,7% vs. 40,7%, respectivamente; ¹¹), nuestros resultados no apoyaron los resultados obtenidos previamente. Se sabe que la mera presencia de la AAF sobre las membranas de los espermatozoides no garantiza una mayor fertilidad (⁵²). Por otra parte, los resultados de nuestro estudio en vacas multíparas (sin diferencia en la fertilidad relativa a la condición de la AAF) y nuestro estudio en vaquillonas (toros AAF positivos exhibieron menor fertilidad que toros AAF negativos) no son completamente sorprendentes, dada la afirmación anterior de que se conocen algunos, pero no todos los atributos del espermatozoides necesarios para la fertilización, mientras que otros siguen siendo desconocidos (Tabla 1).

Con un número limitado de toros e IATF en ambos experimentos presentados aquí, parece que la condición AAF negativo no fue un factor limitante para la fertilidad medida por P/IATF. Los mismos toros y eyaculados se utilizaron para ambos experimentos, y la fertilidad relativa, para cada toro y en los dos experimentos, parecía ser similar para cinco de los seis toros (Tabla 2). El toro C, sin embargo, mostró una diferencia de 18 puntos porcentuales en el cociente P/IATF entre vacas y vaquillonas (45,8% vs. 27,8%, respectivamente). Por lo tanto, se debe tener cuidado al interpretar estos resultados, debido al pequeño número de toros usados, y la observación de que las diferencias en la fertilidad observada en el segundo experimento entre los toros AAF negativos y los AAF positivos desaparecieron cuando se quitó al toro C del análisis estadístico. En últi-

ma instancia, la identificación de la condición AAF positivo o AAF negativo no tuvo éxito como método para evaluar la fertilidad potencial de los toros para ser utilizados en IATF.

Tabla 2. Fertilidad a la primera IATF en vacas multiparas lactantes Nelore y vaquillonas nulíparas Nelore inseminadas con semen AAF positivo o AAF negativo^(*).

		Experimento 1	Experimento 2
		Vacas	Vaquillonas
Toros	Condición FAA	Nº Preñeces/Total IATF (% P/IATF)	Nº Preñeces/Total IATF (% P/IATF)
A	+	51/127 (40,2)	44/112 (39,3)
B	+	55/142 (38,7)	32/98 (32,7)
C	+	60/131 (45,8)	25/90 (27,8)
D	-	57/145 (39,3)	37/104 (35,6)
E	-	59/145 (40,7)	52/120 (43,3)
F	-	55/145 (37,9)	40/93 (43,0)

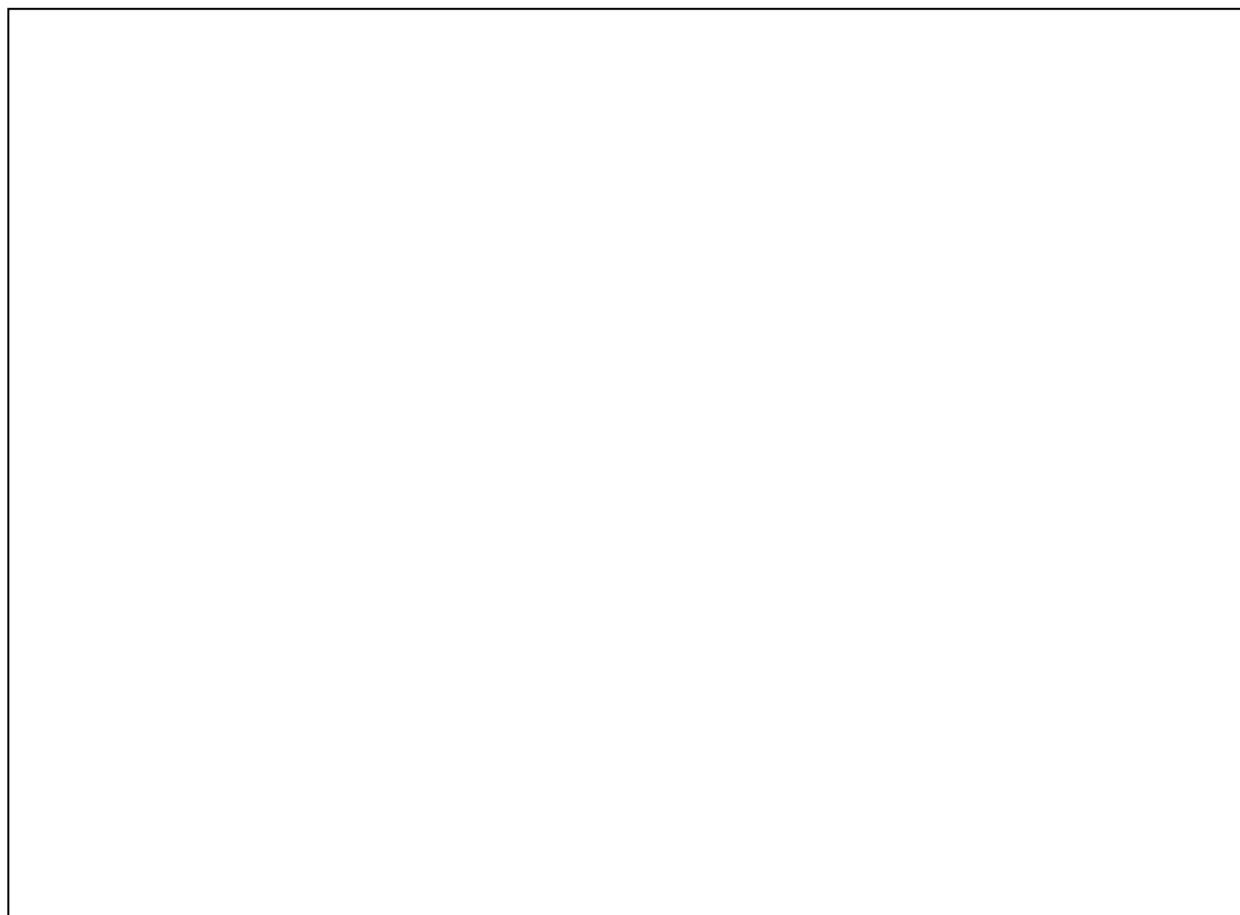
^(*) Adaptado de Dalton y col., 2012 ⁽¹¹⁾

Fertilidad del toro y momento de la IA en relación a la ovulación

En los últimos quince años se han desarrollado numerosos protocolos de sincronización para ganado bovino de razas de carne y de leche, muchos de las cuales incorporan IATF. Entonces,

¿hay pruebas de diferencias de fertilidad entre toros después de la IATF? La respuesta simple es sí, sin embargo, no hay evidencia de que los toros se clasificarán de manera diferente en los programas de IATF en comparación con los programas en base a detección del estro ⁽²⁾.

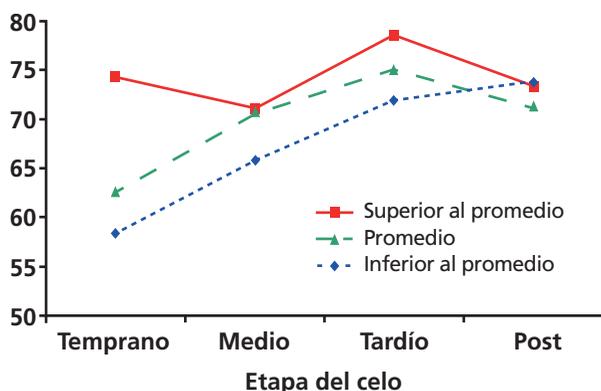
En un estudio clásico, Macmillan y Watson ⁽³⁴⁾ investigaron el efecto de la etapa del celo en el momento de la IA sobre las tasas de no retorno para toros con fertilidad por encima del promedio, promedio, y por debajo del promedio. (La tasa de no retorno es una medida indirecta de la fertilidad, que definió específicamente Rycroft en 1992 ⁽⁴⁴⁾ "como el porcentaje de vacas que no retornan al servicio en un plazo determinado de tiempo después de una inseminación, por lo general de 60 a 90 días.") Como se muestra en la Figura 1, la alta tasa de no retorno después de IA temprana entre los toros con fertilidad por encima de la media (en comparación con los toros con fertilidad promedio y los toros con fertilidad debajo de la media) brinda evidencia de que la fertilidad puede estar asociada con la longevidad de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino. En consecuencia, la IATF puede mag-



nificar las diferencias en la fertilidad del toro ya que aumenta el intervalo de tiempo entre la IA y la ovulación. Alternativamente, se podría esperar que la magnitud de la diferencia de la fertilidad entre toros se minimizara cuando el protocolo de sincronización controle con precisión la IATF y la ovulación dentro de un período determinado, aunque aún desconocido, de "intervalo óptimo" (Figura 1).

También es importante recordar que el transporte sostenido de los espermatozoides requiere de 6 a 12 horas ^(19, 25, 60). Durante este tiempo, los espermatozoides entran al oviducto y se fijan al epitelio ⁽²⁷⁾ para formar un reservorio en el istmo del oviducto ⁽²⁶⁾. El desarrollo del reservorio espermático tiene muchas funciones, sin embargo, dos de las más importantes se cree que son: 1) la liberación de pequeños grupos de espermatozoides para permitir un número limitado cerca del ovocito para reducir la posibilidad de polispermia ^(23, 24), y 2) la creación de un entorno favorable para la capacitación espermática ⁽¹⁵⁾.

Figura 1. El efecto del grupo de fertilidad del toro y la etapa del celo en la IA sobre las tasas de no retorno. (Adaptado de Macmillan y Watson, 1975; ³⁴).



La capacitación espermática, en la que se modifica la membrana plasmática del espermatozoide para permitir a los espermatozoides sufrir la reacción del acrosoma, es un requisito previo para la fertilización ⁽¹⁵⁾. La capacitación consiste en la extracción, adición o modificación de componentes de la membrana plasmática del espermatozoide, muchos de los cuales se producen en el oviducto ^(57, 61). En última instancia, se cree que la capacitación (incluso el desarrollo de la motilidad hiperactivada) en conjunción con un siste-

ma de señalización desconocida entre el complejo cumulus-ovocito y las células oviductales ⁽³²⁾ facilita la liberación de los espermatozoides a partir del epitelio oviductal antes de la fertilización. En consecuencia, en un esfuerzo para optimizar la fertilidad, la IA debe realizarse lo suficientemente cerca de la ovulación para maximizar el acceso de los espermatozoides al ovocito, pero no demasiado tarde para tener un ovocito envejecido esperando la llegada de espermatozoides en el sitio de la fertilización en el oviducto, teniendo en cuenta el tiempo necesario para: 1) el transporte sostenido del espermatozoide, incluso la colonización del istmo, y 2) la capacitación.

Sá Filho y col. ⁽⁴⁷⁾ han descrito más evidencia sobre la importancia de la fertilidad del toro y el momento de la IA en relación con la ovulación en un estudio retrospectivo sobre los factores que afectan la fertilidad de las vaquillonas y vacas de razas de carne. En pocas palabras, Sá Filho y col. ⁽⁴⁷⁾ evaluaron los registros de vacas y vaquillonas de razas de carne lactantes y no lactantes (85% de los cuales eran *Bos indicus*) de diversos lugares de Brasil durante dos temporadas reproductivas consecutivas (2006-2007, n= 27,195; 2007-2008, n= 36 838). Se usaron los registros de los mismos 71 establecimientos ganaderos para ambas temporadas reproductivas y la preñez fue diagnosticada por ecografía transrectal a 28 y 35 d después de la IATF ⁽⁴⁷⁾. Después de combinar los datos de las dos temporadas reproductivas, la tasa de preñez global a la IATF fue de 49,6% (rango 26,8-68,0%; La tasa de preñez a la IATF "se vio afectada repetiblemente por el toro (resultados que van del 7,2% al 77,3%)," además de ser afectada por la raza (*Bos indicus*, *Bos taurus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*), la paridad, la condición corporal y el técnico que realizó la IA ⁽⁴⁷⁾.

El efecto toro notado por Sá Filho y col. ⁽⁴⁷⁾ está probablemente relacionado con los toros con fertilidad promedio y por debajo del promedio utilizados para un sistema de IATF en el que se amplían las diferencias en la fertilidad del toro porque el intervalo desde la IATF a la ovulación se incrementó. Los toros con fertilidad por encima del promedio, tal como han demostrado Macmillan y Watson ⁽³⁴⁾ (Figura 1), dan como resultado fertilidad por encima del promedio en una amplia gama de tiempos de inseminación.

Bibliografía

1. Acevedo, N., J. Bame, L.A. Kuehn, W.D. Hohenboken, D.P. Evenson, and R.G. Saacke. 2002. In: Proc. Nat'l. Assoc. Anim. Breeders 19th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod., Columbia, MO, pp.84-90.
2. Amann, R.P., and J.M. DeJarnette. 2012. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. *Theriogenology*. 77: 795–817.
3. Amann, R.P., and R.H. Hammerstedt. 1993. In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. *J. Androl.* 14:6:397-406.
4. Ballachey, B.E., D.P. Evenson, and R.G. Saacke. 1988. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.* 9:109-115.
5. Beletti, M.E., L.F. Costa, and M.M. Guardieiro. 2005a. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. Morphol. Sci.* 22(2):85-90.
6. Beletti, M.E., L.F. Costa, and M.P. Viana. 2005b. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. *An. Repro. Sci.* 85:105-116.
7. Bellin, M.E., H.E. Hawkins, and R.L. Ax. 1994. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J. Anim. Sci.* 72:2441-2448.
8. Bellin, M.E., H.E. Hawkins, J.N. Oyarzo, R.J. Vanderboom, and R.L. Ax. 1996. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *J. Anim. Sci.* 74:173-182.
9. Bellin, M.E., J.N. Oyarzo, H.E. Hawkins, H. Zhang, R.G. Smith, D.W. Forrest, L.R. Sprott, and R.L. Ax. 1998. Fertility-associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J. Anim. Sci.* 76:2032–2039.
10. Dalton, J.C., A. Ahmadzadeh, B. Shaffi, W.J. Price, and J.M. DeJarnette. 2004. Effect of simultaneous thawing of multiple 0.5-mL straws of semen and sequence of insemination on conception rate in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87:972-975.
11. Dalton, J.C., L. Deragon, J.L.M. Vasconcelos, C.N. Lopes, R.F.G. Peres, and A. Ahmadzadeh. 2012. Fertility-associated antigen on Nelore bull sperm and reproductive outcomes following first-service fixed-time AI of Nelore cows and heifers. *Theriogenology*. 77:389–394.
12. Dresdner, R.D., and D.F. Katz. 1981. Relationship of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. *Biol. Reprod.* 25:920-930.
13. Den Daas, J.H.G., G. DeJong, L.M.T.E. Lansbergen, and A.M. van Wagtenonk-de Leeuw. 1998. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 81:1714-1723.
14. Eid, L.N., S.P. Lorton, and J.J. Parrish. 1994. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol. Reprod.* 51:1232-1237.
15. Ellington, J.E., B.A. Ball, and X. Yang. 1993. Binding of stallion spermatozoa to the equine zona pellucid after coculture with oviductal epithelial cells. *J. Reprod. Fertil.* 98:203-208.
16. Ennen, B.D., W.E. Berndtson, R.G. Mortimer, and B.W. Pickett. 1976. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in 0.25-mL straws. *J. Anim. Sci.* 43:651–656.
17. Evenson, D.P., Z. Darznikiewicz, and M.R. Melamed. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 240:1131-1134.
18. Gledhill, B.L. 1970. Enigma of spermatozoal DNA and male infertility: A review. *Am. J. Vet. Res.* 31:539-549.
19. Hawk, H.W. 1987. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. *J. Dairy Sci.* 70:1487-1503.
20. Ho, H-C., and S.S. Suarez. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*. 122: 519–526.
21. Houghton, P.L., R.P. Lemenager, G.E. Moss, and K.S. Hendrix. 1990. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *J. Anim. Sci.* 68:1428–1437.
22. Howard, J.G., A.M. Donoghue, L.A. Johnston, and D.E. Wildt. 1993. Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biol. Reprod.* 49:131-139.
23. Hunter, R.H., and P.C. Léglise. 1971. Tubal surgery in the rabbit: fertilization and polyspermy after resection of the isthmus. *Am. J. Anat.* 132 45–52.
24. Hunter, R.H. 1973. Polyspermic fertilization in pigs after tubal deposition of excessive numbers of spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 183:57–63.
25. Hunter, R.H.F., and I. Wilmut. 1983. The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. *Anim. Reprod. Sci.* 5:167-173.
26. Hunter, R.H.F., and I. Wilmut. 1984. Sperm transport in the cow: Periovalutary redistribution of viable cells within the oviduct. *Reprod. Nutr. Dev.* 24:597-608.
27. Hunter, R.H.F., B. Flechon, and J.E. Flechon. 1991. Distribution, morphology and epithelial interaction of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study. *Tissue and Cell.* 23:641-656.
28. Karabinus, D., C.J. Vogler, R.G. Saacke, and D.P. Evenson. 1997. Chromatin structural changes in bovine sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *J. Androl.* 18:549-555.
29. Kasimanickam, R., R.L. Nebel, I.D. Peeler, W.L. Silvia, K.T. Wolfe, A.J. McAllister, and B.G. Cassell. 2006. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology*. 66:1307-1315.
30. Killian, G.J., D.A. Chapman, and L.A. Rogowski. 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bulls. *Biol. Reprod.* 49:1202-1208.
31. Koeford-Johnsen, H. H. 1972. Cervical secretions as a selective filter for abnormal types of spermatozoa. *Arsberetning Inst. For Sterilitetsforskning, Konelige Veterinaer-og Landbohojskole* 15:171-176.

32. Kölle, S., S. Dubielzig, S. Reese, A. Wehrend, P. König, and W. Kümme. 2009. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: Ex-vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biol. Reprod.* 81:267-274.
33. Lagerlof, N. 1934. Morphological studies on the changes in the sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 19:254-267.
34. Macmillan, K.L., and J.D. Watson. 1975. Fertility differences between groups of sires relative to the stage of oestrus at the time of insemination. *Anim. Prod.* 21:243-249.
35. Miller, D.J., M.A. Winer, and R.L. Ax. 1990. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.* 42:899-915.
36. Mitchell, J.R., P.L. Senger, and J.L. Rosenberger. 1985. Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. *J. Anim. Sci.* 61:956-963.
37. Mullins, J., and R.G. Saacke. 1989. Study of the functional anatomy of the bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anat. Rec.* 225:106-117.
38. Nadir, S., R.G. Saacke, J. Bame, J. Mullins, and S. Degelos. 1993. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 71:199-204.
39. Nass, S.J., D.J. Miller, M.A. Winer, and R.L. Ax. 1990. Male accessory sex glands produce heparin-binding proteins that bind to caudal epididymal spermatozoa and are testosterone dependent. *Mol. Reprod. Dev.* 25:237-246.
40. Ostermeier, G.C., G.A. Sargeant, B.S. Yandell, D.P. Evenson, and J.J. Parrish. 2001. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J. Androl.* 22:4:595-603.
41. Overstreet, J.W., G.W. Cooper, and D.F. Katz. 1978. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II. The sustained phase of transport. *Biol. Reprod.* 19:115.
42. Rodriguez-Martinez, H. 2001. Sperm function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 44 Special Issue, 102-113.
43. Robbins, R.K., R.G. Saacke, and P.T. Chandler. 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *J. Anim. Sci.* 42:145-154.
44. Rycroft, H. 1992. Factors influencing nonreturn data. In: *Proc. Nat'l Assoc. Anim. Breeders 14th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod.*, Columbia, MO, pp.43-46.
45. Saacke, R.G., S. Nadir, and R.L. Nebel. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology.* 41:45-50.
46. Saacke, R.G., J.M. DeJarnette, J.H. Bame, D.S. Karabinus, and S.S. Whitman. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology.* 50:117-128.
47. Sá Filho, O.G., M. Meneghetti, R.F.G. Peres, G.C. Lamb, and J.L.M. Vasconcelos. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology.* 72: 210-218.
48. Sakkas, D., G. Manicardi, P.G. Bianchi, D. Bizzaro, and U. Bianchi. 1995. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 52:1140-1155.
49. Sakkas, D., F. Urner, P.G. Bianchi, D. Bizzaro, I. Wagner, N. Jaquenoud, G. Manicardi, and A. Campana. 1996. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod.*
50. Senger, P.L., J.K. Hillers, J.R. Mitchell, W.N. Fleming, and R.L. Darlington. 1984. Effects of serum treated semen, bulls, and herdsmen-inseminators on conception to first service in large commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 67:686-692.
51. Setchell, B.P., M.J. Occhio, M.S. Hall, M.S. Lourie, M.J. Tucker, and J.L. Zupp. 1988. Is embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile males? *J. Reprod. Fertil.* 83:567-574.
52. Sprott, L.R., M.D. Harris, D.W. Forrest, J. Young, H.M. Zhang, J.N. Oyarzo, M.E. Bellin, and R.L. Ax. 2000. Artificial insemination outcomes in beef females using bovine sperm with a detectable fertility-associated antigen. *J. Anim. Sci.* 78:795-798.
53. Suarez, S.S., and X. Dai. 1992. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.* 46:686-691.
54. Thundathil, J.R. Meyer, A.T. Palasz, A.D. Barth, and R.J. Mapletoft. 2000. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology.* 54:921-934.
55. Vogler, C.J., J.H. Bame, J.M. DeJarnette, M.L. McGilliard, and R.G. Saacke. 1993. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology.* 40:1207-1219.
56. Walters, A.H., R.G. Saacke, R.E. Pearson, and F.C. Gwazdauskas. 2006. Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. *Theriogenology.* 65:1016-1028.
57. Wassarman, P. M. 1999. Mammalian Fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell.* 96:175-183.
58. Williams, W.W., and A. Savage. 1925. Observations on the seminal micropathology of bulls. *Cornell Vet.* 15:353-375.
59. Williams, W.W., and A. Savage. 1927. Methods of determining the reproductive health and fertility of bulls. *A*
60. Wilmut, I., and R.H.F. Hunter. 1984. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. *Reprod. Nutr. Develop.* 24:461-465.
61. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. 1994. In: Knobil, E., and J.D. Neill (eds.), *The Physiology of Reproduction*, Vol 1. New York: Raven Press, pp. 189-290.