

Artículo original:

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE SEMEN Y SU RELACIÓN CON LA FERTILIDAD EQUINA

Semen analysis methods and their relationship with equine fertility

D. Neild

*Cátedra de Teriogenología,
Instituto de Investigación y Tecnología en
Reproducción Animal (INTRA)
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad
Buenos Aires, Argentina.*

*Email:
deborah.neild@gmail.com*

*Palabras Clave:
Equino, semen, evaluación*

INTRODUCCIÓN

El objetivo general de la valoración de semen es evaluar el estatus reproductivo de padrillos, o de muestras particulares de semen, ya sea antes de la temporada reproductiva o de la compra del animal, o para ser usado en inseminación artificial (IA), para su criopreservación o para su uso en otras técnicas de reproducción asistida (ART) más complejas. Pruebas de rutina incluyen la evaluación del volumen, pH y concentración del eyaculado, junto con la movilidad progresiva y morfología de los espermatozoides. Pruebas de complejidad intermedia incluyen la supervivencia espermática, bacteriología, citología, y la viabilidad y funcionalidad de las membranas espermáticas. Por último, pruebas más avanzadas dependen de la destreza del operador y en muchos casos de tecnología fluorescente (por ejemplo, evaluar el estado acrosomal, la capacitación y la cromatina o ensayar la unión a la zona pelúcida) (Baumber-Skaife, 2011). Sin embargo, la verdadera prueba de fertilidad es la tasa de preñez lograda luego de servir o inseminar un número alto de yeguas reproductivamente sanas. Esto último es difícil de lograr debido a que muchos padrillos solo sirven un número limitado de yeguas y que además hay que tener en cuenta la fertilidad de la yegua y el manejo reproductivo realizado con ambos progenitores (Love, 2011). Asimismo, a pesar que en la actualidad se pueden evaluar muchos parámetros seminales, es aceptado que aún es virtualmente imposible predecir la fertilidad de un padrillo. El intento de encontrar una buena correlación entre la fertilidad y los análisis de semen cuantitativos, usando parámetros estándar o evaluaciones más sofisticadas, ha fracasado en varias especies, incluyendo la equina (Rodríguez Martínez, 2003; Colenbrander *et al.*, 2003; Kuisma *et al.*, 2006). La relación entre la calidad seminal dada por las diferentes pruebas y la fertilidad a campo es bastante discutible y podría deberse al uso de un número limitado de animales evaluados (tanto de hembras como de machos) y/o al uso de pruebas de fertilidad inconstantes. En general, la baja calidad espermática puede potencialmente indicar subfertilidad mientras que un semen de buena calidad no garantiza la fertilidad de un padrillo (Baumber-Skaife, 2011). Una de las razones para esto es que aún no se han identificado todas las características funcionales que un espermatozoide requiere para lograr fertilizar un ovocito. No obstante lo antedicho, siguen empleándose diversas técnicas para analizar la calidad seminal, tanto previo a la aplicación de biotecnologías reproductivas como luego de las mismas, para verificar los resultados obtenidos. Es así que la calidad seminal se puede describir en términos de número total de espermatozoides viables, morfológicamente normales, con movilidad progresiva, con membranas íntegras y funcionales y con integridad de ADN.

SELECCIÓN ESPERMÁTICA

Para llegar al sitio de la fertilización *in vivo*, los espermatozoides deben pasar algunas barreras en el tracto genital de la yegua, siendo este trayecto un filtro natural para los espermatozoides menos viables. Una selección más activa parecería ocurrir a nivel de la interacción de los espermatozoides con las células epiteliales del oviducto, resultando en la selección de espermatozoides viables, móviles capaces de realizar la capacitación y reacción acrosomal y unirse con la zona pelúcida del ovocito. Cuando se realiza la IA

o la transferencia de ovocitos (TO), estos procesos de selección natural se llevan a cabo normalmente. Sin embargo, en técnicas de reproducción asistida más avanzadas, como por ejemplo la fertilización *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI), la selección espermática se lleva a cabo en el laboratorio.

La selección espermática también se utiliza para mejorar la muestra seminal, ya sea para la inseminación tradicional (en el cuerpo del útero) o la IA de baja dosis (en la unión útero-tubárica),

como también para lograr mejores resultados con el uso del semen criopreservado o sexado.

Los métodos de selección incluyen: migración de espermatozoides (swim-up, swim-down), filtración (a través de lana de vidrio, Sephadex o una combinación de ambas), centrifugación a través de coloides (simples o gradiente de densidad). La eficacia de cada uno de ellos se verifica evaluando diferentes parámetros seminales: número de células recuperadas, movilidad, morfología, viabilidad, integridad de membrana citoplasmática y acrosomal, funcionalidad de membranas, capacitación, condensación e integridad de la cromatina.

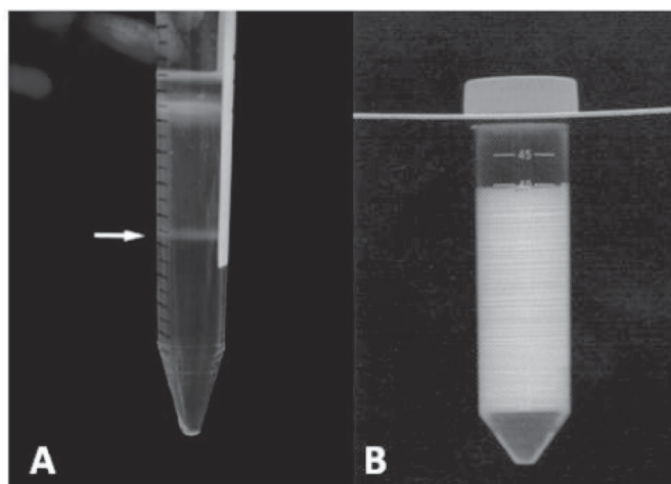


Figura 1. Métodos de selección de semen por centrifugación a través de coloides, utilizando gradientes de densidad (A) o coloides simples (B).

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL

De los parámetros seminales evaluados, el análisis de la movilidad espermática es considerado uno de los más importantes y generalmente se piensa que refleja además la viabilidad de la muestra (Varner *et al.*, 1991). Se considera que espermatozoides inmóviles o con poca movilidad progresiva son incapaces de lograr la fertilización sin la ayuda de alguna técnica de reproducción asistida por lo tanto, a pesar que algunos autores consideran que la movilidad progresiva es el parámetro que mejor predice la fertilidad de un padrillo (Voss *et al.*, 1981), no se debería utilizar solo la evaluación de este parámetro. La movilidad espermática se puede evaluar con microscopio de contraste de fase y platina termostatzada o con los sistemas computarizados como el Computer Assisted Semen Analysis (CASA) que permiten analizar en forma más objetiva distintos aspectos de la movilidad. Existen además las pruebas fluorescentes funcionales para las mitocondrias, que han sido correlacionadas positivamente con la movilidad y viabilidad espermáticas.

La morfología clásicamente se evalúa utilizando microscopios de contraste de fase o de contraste diferencial interferencial (DIC). También se puede realizar la morfometría con sistemas computarizados. Un nuevo enfoque utiliza a la muestra seminal como material de biopsia y relaciona las

anormalidades morfológicas con varias fases de la espermatogénesis, espermiación y tránsito epididimario y con la interacción de los espermatozoides con el plasma seminal, siendo de esta manera una herramienta de mucho valor clínico (Veeramachaeni, 2011).

La membrana plasmática juega un papel muy importante en la supervivencia y función espermática por su gran diversidad de roles y la distribución heterogénea de lípidos y proteínas en la misma, evidenciando una especialización por regiones que además se modifica continuamente, según el ambiente en que se encuentran los espermatozoides (Stout y Colenbrander, 2011). Esto ha posibilitado el desarrollo de una amplia gama de pruebas para evaluarla, algunas de las cuales utilizan microscopía óptica mientras que otras utilizan marcadores fluorescentes, precisando un microscopio de epifluorescencia o un citómetro de flujo para realizar el análisis. La citometría de flujo se ha convertido en la técnica de elección porque permite analizar en forma rápida y objetiva múltiples parámetros espermáticos en millones de células. Mayormente se ha adoptado la prueba hipoosmótica para evaluar la funcionalidad de la membrana, por su sencillez y bajo costo. Hay además varias pruebas que evalúan la capacitación espermática y la reacción acrosomal. Entre ellas se pueden incluir la adquisición de movilidad hiperactivada, la fosforilación en residuos de tirosina, los movimientos del calcio y de lípidos de membrana como el colesterol y la fosfatidilserina que indican cambios en la fluidez de la bicapa lipídica. También se incluyen técnicas para verificar la integridad acrosomal y la respuesta de los espermatozoides a inductores de la reacción acrosomal. Sin embargo, si bien todas estas pruebas aportan información valiosa sobre el potencial fertilizante de una muestra de semen, sigue siendo necesario implementar ensayos para determinar su efecto real sobre la fertilidad a campo de los padrillos.

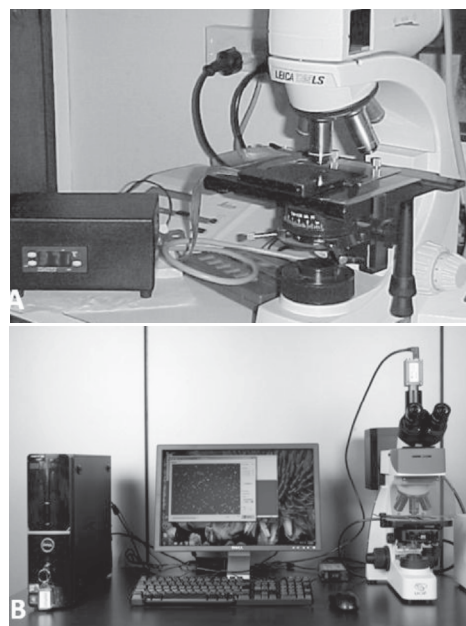


Figura 2. Evaluación espermática mediante microscopio óptico o de contraste y con platina termostatzada (A) o sistemas computarizados como el Computer Assisted Semen Analysis (CASA) (B).

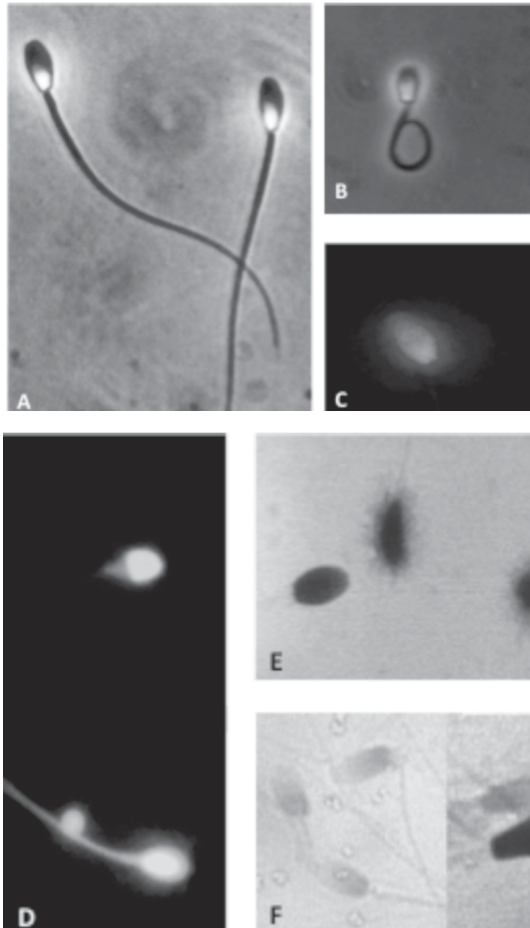


Figura 3. Evaluación de espermatozoides equinos: morfología con microscopio de contraste de fase (A), funcionalidad de membrana con la prueba hipoosmótica (B), viabilidad espermática con tinción Hoechst (C) o con tinción CFDA/PI (D), fragmentación de la cromatina con la prueba del halo (E) y condensación de la cromatina con la tinción de Azul de Toluidina (F).

Por último, se han incorporado técnicas para evaluar tanto la condensación como la integridad de la cromatina espermática, siendo de especial importancia porque se ha confirmado que espermatozoides con el ADN alterado pueden realizar la fertilización pero el subsiguiente desarrollo embrionario se encuentra comprometido, llevando a pérdidas embrionarias tempranas. Además, en la evaluación seminal muchos padrillos pueden tener movilidad y morfología similares entre sí y sin embargo tener porcentajes de preñez/ciclo muy diferentes (entre 45-75%). Se ha reportado que la evaluación del daño de ADN con el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) correlaciona bien con la fertilidad y el desarrollo embrionario en padrillos (Love y Kenney, 1998; Love, 2005).

En conclusión, los métodos para evaluar cada una de las características espermáticas son muy diversos y cada laboratorio adopta el que mejor se adapta a sus requerimientos y condiciones particulares y en función de la biotecnología reproductiva que pretende aplicar para lograr el nacimiento de un potrillo vivo, especialmente de animales de alto valor genético o deportivo.

REFERENCIAS

1. Baumber-Skaife J. 2011. Evaluation of semen. In: McKinnon A, Squires E, Vaala W and Varner D (eds). *Equine Reproduction. Second edition. Blackwell Publishing Ltd.* pp. 1278-1291.
2. Colenbrander B, Gadella B, Stout T. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Domest. Anim.*, 38: 305.
3. Kuisma P, Andersson M, Koskinen E, Katila T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Vet. Scand.*, 48:14-21.
4. Love CC, Kenney RM. 1998. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*, 50: 955-72.
5. Love CC. 2005. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. *Anim. Reprod. Sci.*, 89: 39-45.
6. Love CC. 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76:547-557.
7. Rodríguez-Martínez H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopía? *Reprod. Domest. Anim.*, 38: 312.
8. Stout TA, Colenbrander B. 2011. Evaluation of the plasma membrane. In: McKinnon A, Squires E, Vaala W and Varner D (eds). *Equine Reproduction. Second edition. Blackwell Publishing Ltd.* pp. 1498-1505.
9. Varner DD, Schumacher J, Blanchard TL, Johnson L. 1991. Breeding soundness examination. In: Varner DD, Schumacher J, Blanchard TL, Johnson L (eds). *Diseases and Management of Breeding Stallions. Goleta, CA: American Veterinary Publications*, pp. 61-96.
10. Veeramachaeni, DNR. 2011. Spermatozoal morphology. In: McKinnon A, Squires E, Vaala W and Varner D (eds). *Equine Reproduction. Second edition. Blackwell Publishing Ltd.* pp. 1297-1307.
11. Voss JL, Pickett BW, Squires EL. 1981. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship with fertility. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 178: 287-9.