

MANEJO DE LA FERTILIDAD DE LOS TOROS PARA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD

FERTILITY MANAGEMENT OF BULLS TO IMPROVE BEEF CATTLE PRODUCTIVITY

Jacob C. Thundathil*, Alysha L. Dance, John P. Kastelic

ABSTRACT

La demanda global de proteína animal está aumentando, por esta razón, se necesita mayor eficiencia en la producción de alimentos. En ese sentido, es de importancia particular mejorar la reproducción del ganado de carne, especialmente la del toro, ya que mediante el uso de inseminación artificial, un solo toro tiene la capacidad de fecundar cientos de vacas. Con el propósito de mejorar la fertilidad del ganado, es preciso encontrar las bases genéticas para las características reproductivas y determinar su influencia sobre la fertilidad de los machos y las hembras; el uso de esta información es clave para la selección de los reproductores. Para aumentar la rentabilidad, es importante la selección genómica y la nutrición, ambas características deben ser abordadas de manera eficaz durante las etapas tempranas de vida de los toros reproductores. La evaluación reproductiva tradicional de los toros, así como el análisis sistemático del semen congelado, son procedimientos que permiten eliminar los toros y el semen con anomalías importantes. Sin embargo las muestras de semen clasificadas como satisfactorias, sobre la base de métodos tradicionales, difieren en cuanto a la fertilidad. Las pruebas avanzadas de función espermática, han sido desarrolladas para evaluar características espermáticas, compensatorias y no compensatorias (sub-microscópicas), estos procedimientos pueden predecir tales variaciones en la fertilidad (compensable; no compensable). El nuevo conocimiento sobre las modulaciones epigenéticas del ADN y el ARN espermáticos, es fundamental para refinar y expandir el uso de las pruebas de función espermática. El semen sexado más las tecnologías reproductivas avanzadas (aspiración folicular *ovum pick*, producción *in vitro* de embriones), pueden maximizar la eficiencia de las ganaderías de carne. Esta revisión está centrada en las consideraciones genéticas necesarias para la selección de los toros, la fisiología del desarrollo reproductivo, la evaluación del potencial reproductivo de los toros, los avances recientes en la evaluación del semen congelado, además del uso actual y creciente que la producción ganadera está haciendo del semen sexado.

1. Introducción

Se estima que para el año 2050, la población mundial será de 9×10^9 , este aumento exige que la producción de alimentos sea más eficiente (1). En Estados Unidos el rebaño de vacas de carne está compuesto por $\sim 35 \times 10^6$ vientres, con un modesto incremento anual del 3% en el índice reproductivo, cada año la población tendría 1×10^6 más terneros (2). Irónicamente, el bajo desempeño reproductivo, se constituye como la causa más frecuente para descartar las vacas (3). El nacimiento de terneros es esencial para producir alimento y también para el mantenimiento de los rebaños destinados a la reproducción; en la industria ganadera se asume que la fertilidad es cinco veces más importante que otras características de producción, por ello los machos destinados a servir anualmente grupos de más de 20 hembras o aquellos cuyo semen congelado servirá para fecundar cientos de vacas, deben ser clasificados como reproductores satisfactorios a partir de una evaluación reproductiva (*bull breeding soundness evaluation* BBSE). Debido a diferencias sub-microscópicas la fertilidad varía $\sim 20\%$ entre los toros clasificados como satisfactorios a partir de una BBSE. Existen dos tópicos relevantes, 1) la selección confiable de los toros superiores, 2) el mercado de semen congelado.

2. Uso de la genética y la genómica para la selección de los toros

La selección genética disminuye el intervalo generacional, además también tiene la capacidad de incrementar, la seguridad de las predicciones realizadas y de mejorar la intensidad de selección (4,5). La selección basada en el genoma, requiere cuantificar los marcadores de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) y determinar sus efectos sobre el fenotipo, lo anterior a partir de una población de referencia lo bastante grande para poder realizar medidas confiables (6,7). Estos

datos pueden ser usados para estimar valores de tipo genómico directo (DGV), aumentar la selección de genotipos específicos (8,9) y en consecuencia acelerar el progreso genético (4). En comparación con las razas dedicadas a la producción de carne, la selección basada en el genoma, es mucha más avanzada en la ganadería de tipo lechero. Los desafíos incluyen, 1) el desarrollo de estrategias basadas en el genoma, las cuales sirvan para todas las razas, 2) la validación de los *loci trait quantitative* (QLT) y 3) la carencia de datos (10). Por ejemplo, en los países tropicales el ganado Nelore, tiene un papel destacable en la producción de carne. En consecuencia en el trópico, el mejoramiento genético tanto en la producción como en la fertilidad de esta raza, mejorara de forma sustancial la producción de carne. La precisión de las predicciones genómicas en el ganado Nelore, está influenciada por la relación genética entre la población evaluada y la de referencia (10), además el valor de reproducción estimado ha sido determinado con un panel de SNP de alta densidad que tiene la capacidad de identificar los *loci* que afectan la circunferencia escrotal (SC) (11).

3. Desarrollo reproductivo de los toros

3.1 Regulación de la pubertad en los toros

La pubertad en los toros, es definida como el momento en el cual, el eyaculado de un individuo tiene 50×10^6 espermatozoides o más, y un porcentaje de motilidad espermática mayor al 10% (12). Además los toros deben tener una libido adecuada y un desarrollo del pene que garantice la eyaculación y la copula (13). La pubertad es regulada por el eje -hipotálamo / hipófisis / testículo-. La liberación pulsátil de GnRH por parte del hipotálamo, induce que los gonadotrofos de la adenohipófisis secreten pulsos de LH y FSH, a su vez la LH causa que las células de Leydig liberen pulsos de testosterona la cual es convertida por las células de Sertoli en dihidrotestosterona y estradiol. Para la espermatogénesis normal es esencial que en los túbulos del epitelio seminífero haya altas concentraciones de testosterona. El funcionamiento de las células de Sertoli es regulado por la FSH (6) y por la testosterona (señal de esteroides no clásica) (14,15). En los toros pre púberes la testosterona y el estradiol disminuyen la liberación de GnRH; sin embargo cuando la pubertad se aproxima, las neuronas que secretan GnRH presentan menor sensibilidad a la testosterona y el estradiol causando que el individuo alcance la pubertad debido al aumento de las concentraciones de GnRH, LH, FSH y testosterona (2). Las neuronas que producen GnRH están relacionadas con otras neuronas (sensores metabólicos) las cuales transmiten el estatus nutricional a través de los nutrientes y de las concentraciones de leptina, factor como insulínico (IGF-I), insulina y hormona del crecimiento (2) gracias a esto las neuronas que secretan GnRH superan la retro alimentación negativa causada por los esteroides y aumentan la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH.

3.2 Cambios testiculares y endocrinos durante el desarrollo reproductivo del toro

El desarrollo reproductivo de un toro consta de tres periodos: infantil, pre púber y pubertad. El periodo infantil va de la semana 0 a la 8 y se caracteriza por baja secreción de gonadotropinas y testosterona. Sin embargo durante el periodo pre púber alrededor de las semanas 8 a la 20 ocurre un aumento transitorio (aumento temprano de gonadotropinas) en la secreción de gonadotropinas. Las concentraciones de LH y FSH incrementan a partir de las semanas 4-5,

alcanzan el pico en las semanas 12-16, posteriormente descienden y alcanzan el nadir durante la semana 25. Este aumento en la LH afecta el desarrollo sexual del toro y esta inversamente relacionado con la edad durante la pubertad (16,17). Se atribuye que durante la semana 25 el aumento en la testosterona causa el descenso de las gonadotropinas (18). Después de la pubertad del toro, cada pulso de GnRH es seguido por una secreción pulsátil de gonadotropinas y testosterona (4-8 pulsos diarios) (2). El aumento temprano de gonadotropinas es un evento relevante para el desarrollo reproductivo (19,20). Antes de la semana 25 los testículos están compuestos por: pre espermatogonias, espermatogonias, células de Leydig adultas y células de Sertoli no diferenciadas. Poco después durante la pubertad ocurre un rápido desarrollo testicular (20), el cual está marcado por: un incremento en el diámetro y la longitud de los túbulos seminíferos, proliferación y diferenciación de las células germinales, desarrollo de las células de Leydig alrededor de la semana 30, y de las células Sertoli durante las semanas 30-40 y finalmente maduración espermática a las semanas 32-42.

3.3 Nutrición y desarrollo reproductivo de los toros

La nutrición durante las primeras etapas de vida afecta el potencial reproductivo de los toros. Alimentar a los toros a partir de las semanas 10 a 30 con ~130% de los requerimientos energéticos y de proteína, tiene como consecuencia que estos machos presenten a la semana 74, mayor producción espermática y peso testicular, cuando se les compara con los toros alimentados con el 100% de mantenimiento (20,21). La nutrición adecuada durante las primeras etapas de vida, tiene efectos benéficos, los cuales son atribuidos, al aumento en la secreción de LH durante el aumento temprano de esta hormona. Por otra parte es importante enfatizar, que los efectos perjudiciales causados por una mala nutrición, durante las primeras etapas de vida, no pueden ser corregidos mediante la incorporación de suplementos en la pubertad, en consecuencia se acepta que la nutrición temprana pre determina: la edad a la cual los machos bovinos alcanzan la pubertad, el tamaño testicular que tenga un individuo sexualmente maduro y el potencial de producción espermática. Debido a que el aumento temprano, en la secreción de gonadotropinas se asocia, con niveles mayores de IGF-I, se postula que este factor puede estar involucrado, en la regulación del aumento temprano de gonadotropinas. Recientemente se condujo un estudio en terneros machos, en el cual los toros que recibieron, una alta nutrición durante las etapas tempranas de vida, presentaron de forma más precoz y sustancial el aumento temprano de IGF-I y LH (22). Además los toros que fueron alimentados, con dietas de nutrición alta durante sus etapas tempranas de desarrollo, en comparación con aquellos alimentados con dietas de baja nutrición, presentaron mayor tamaño testicular y pubertad más temprana (~45 días antes basándose en la calidad seminal). Ha sido demostrado que los toros alimentados con dietas de alta nutrición, presentan mejoramiento morfológico en sus testículos (ejemplo: mayor tamaño), madurez sexual temprana y diariamente mejor producción espermática (21). En consecuencia se debe afirmar, que la suplementación nutricional temprana, mejora el futuro potencial reproductivo de los toros. Existe la tendencia de seleccionar el ganado de carne, a partir de la eficiencia nutricional mejorada, esta selección se basa en el consumo residual de alimento, la diferencia entre el consumo esperado y el actual (observando el peso corporal y la tasa de ganancia) (23). Ya que esta metodología de selección no prioriza la reproducción, es muy probable que los toros con una base

genética de eficiencia alimenticia mejorada, puedan tener comprometido su desarrollo reproductivo. En ese sentido Awda *et al* (24) reportan que los toros jóvenes que poseen mayor eficiencia alimenticia a su vez presentan disminución en la calidad seminal y en las medidas de CS. Es por ello que estos efectos indeseables deben ser observados en los programas de selección de características múltiples.

3.4 Predictores tempranos de fertilidad y uso de las características del toro para mejorar los rebaños

Diferentes características reproductivas de los toros y su relación con otras medidas han sido revisadas (25); esta información pudiera ser utilizada para determinar algunos predictores tempranos de fertilidad de los toros. Además se sabe que algunas características de los toros, tienen incidencia positiva en la fertilidad del rebaño, ya que mejoran el rendimiento reproductivo de las hembras. Se reconoce de manera amplia que además de estar relacionada con la calidad espermática y la fertilidad de los toros (26), la CS actúa de forma importante sobre las características reproductivas de la progenie femenina, dentro de la influencia de la CS encontramos: la edad a la cual las hembras alcanzan la pubertad, el primer estro y el primer parto, también se ha establecido el papel de la CS en, el índice de preñez anual, el índice de preñez durante el tiempo de vida y el índice de ovulación de las vacas (25). Por otra parte se encontró que los toros Nelore que presentan mayores medidas de SC a las 12 meses, engendraron hijas que alcanzaron mayor índice de preñez a los 16 meses y por ende una menor edad al primer parto (27). Antes de la pubertad las concentraciones de las gonadotropinas y de GnRH presentan las siguientes relaciones, las concentraciones séricas de FSH se asocian con la fisiología del testículo y con la cantidad de células de Sertoli, las concentraciones de LH se asocian con la edad a la pubertad, mientras que las concentraciones de GnRH influyen sobre las concentraciones de testosterona y en la fertilidad posterior del toro (28). Además de predecir el desarrollo y la función del testículo en el toro, en machos de diferente especie las concentraciones de hormona GnRH han sido usadas para predecir la función reproductiva de su progenie femenina (25). Por lo tanto tenemos que las características mencionadas sirven como marcadores de la fertilidad y el potencial reproductivo de los propios toros, pero es clave señalar que también influyen de forma importante sobre su progenie femenina. Así que la identificación y el uso de marcadores genéticos asociados con estas características reproductivas, tiene implicaciones en el mejoramiento de la fertilidad de los rebaños (25).

4. Evaluación del potencial reproductivo

Recientemente en un seminario dedicado a la reproducción del Toro, la Sociedad de Teriogenología presentó una revisión detallada sobre este (evaluación del potencial reproductivo) (31). A continuación se expone un resumen de los conceptos claves incluidos en dicha publicación. Ya que ① Un toro puede ser usado para cubrir un gran número de vacas durante una temporada de monta, o ② su semen puede ser congelado y usado de manera extensiva mediante IA, es imperativo predecir la fertilidad de los toros para no incidir de manera negativa la eficiencia reproductiva de los rebaños. Aunque la libido y la capacidad de aparearse exitosamente de los toros pueden ser predichas con relativa facilidad, tales pruebas no se realizan de manera regular.

En cualquier caso, la fertilidad potencial de un toro se predice mediante la realización de una BBSE. En cuanto los estándares de la Sociedad de Teriogenología (www.therio.org) están destinados para evaluar la probabilidad de que un toro engendre durante temporadas de monta de 65 a 70 días sirviendo grupos de más de 25 hembras saludables y con ciclo estral normal. Las clasificaciones de BBSE están basadas en: integridad física del toro, desarrollo testicular, movilidad y morfología espermática. Un BBSE incluye los siguientes tópicos: evaluación general de la salud, medida de la SC, revisión de las características físicas generales; los toros que tienen estándares mínimos son sometidos a una evaluación seminal detallada.

La movilidad espermática se estima observando el semen sobre un portaobjetos el cual debe estar limpio y tibio. Se debe usar bajo aumento para detectar la movilidad en masa, esta variable se relaciona con la movilidad y la concentración, en cuanto a la movilidad progresiva se evalúa a mayor aumento (400x). Para analizar la morfología, el semen puede ser teñido con eosina-nigrosina o fijado con formalina neutra al 10%, se deben contar al menos 100 células o hasta 300 si el tipo de anomalías presentes en la muestra es múltiple. Un toro saludable, con potencial reproductivo, SC adecuada, más del 30% de movilidad progresiva, más del 70% de normalidad espermática y menos del 20% de espermatozoides con defectos de cabeza, es designado como un REPRODUCTOR POTENCIAL SATISFACTORIO. Los toros que fallan en alcanzar los estándares mínimos requeridos pero de los cuales se espera que mejoren son clasificados como DIFERIDOS. Sin embargo aquellos toros afectados por defectos de carácter hereditario, medida de SC pequeña, degeneración testicular, daño físico o enfermedad, son clasificados como REPRODUCTOR POTENCIAL NO SATISFACTORIO.

5. Genética de la calidad seminal

En toros de raza Holstein con diferentes clases de movilidad espermática (movilidad pobre 26% vs movilidad normal 73%), se ha reportado que varios SNPs cercanos a una cohorte de genes están involucrados en la movilidad de los espermatozoides; estos resultados se infieren a partir de estudios de asociación genómica amplia (33). Diversos trabajos han señalado la compleja regulación genética que influye sobre la movilidad espermática y la existencia de marcadores genéticos útiles para realizar selección asistida por marcadores. Los investigadores también identificaron marcadores y genes candidatos asociados con otras variables tales como el volumen y la concentración del eyaculado (34). De manera similar otros estudios reportaron los efectos de los SNPs sobre la producción de semen, dichos trabajos incluyen genes candidatos que afectan, la concentración espermática, el número de espermatozoides, el volumen de semen y el grado de movilidad (35). En consecuencia, la calidad seminal aparentemente está controlada genéticamente y asociada con marcadores genéticos, los cuales podrían ser usados con propósitos de selección genómica. La disponibilidad de ensayos genómicos, permitirá detectar de manera temprana a los toros con deficiencias importantes en la producción de semen, cabe destacar la importancia económica de detectar este tipo de toros. Sin embargo, las pruebas genómicas deben alcanzar una confiabilidad alta, antes de ser usadas como herramienta única de descarte de los toros. Además si en el ganado dedicado a la producción cárnica se pretenden establecer marcadores y asociaciones con los genes candidatos y las características de producción, es indispensable asegurar la

correlación genética entre las características de producción y las reproductivas. Entender estas correlaciones es importante, para poder predecir los cambios en la producción, debidos a la selección de características reproductivas o los cambios esperados en el rendimiento reproductivo debidos a la selección de otras características (32).

6. Evaluación de semen congelado

Para la fertilidad de los rebaños es crítico, almacenar y manipular con procedimientos estándar el semen congelado, así como depositar un mínimo de espermatozoides de buena calidad, en el cuerpo del útero unas horas antes de que ocurra la ovulación (36). Una descripción completa en relación a la evaluación de semen congelado esta resumida en la referencia (37). Los componentes críticos de la evaluación del semen descongelado son: ① la viabilidad post-descongelación (porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, tasa de progresión e integridad del acrósona), ② el número de espermatozoides por dosis y ③ la morfología espermática. La viabilidad espermática debería ser evaluada inmediatamente después de descongelar la pajuela y después de dos horas de incubación a 37°C. Las pajuelas deben ser descongeladas a 37°C por un periodo de 1 minuto. Una pequeña gota de semen es colocada sobre un portaobjetos tibio, cubierta con una laminilla y observada con aumento de 400x. Se deben estimar los números de células con movimiento progresivo y el de células muertas (no móviles o con movimiento progresivo) además del porcentaje de células con movimiento progresivo. La evaluación precisa incluye el análisis de más de una placa, en la cual se observan de 10 a 15 campos infiriendo resultados a partir de ~500 células. El índice promedio de progresión espermática se gradúa sobre una escala de 0 (ausencia de movimiento) a 5 (movimiento muy rápido, con dificultad de seguir la movilidad individual de cada célula). El estándar mínimo es de 25% de espermatozoides móviles a la hora 0, después de un periodo de incubación de 2 horas la movilidad deberá estar comprendida entre 3% y 5% de espermatozoides móviles. Cuando la movilidad se evalúa mediante un sistema de análisis seminal asistido por computadora (CASA), generalmente los valores registrados son menores en comparación con lo observado por un técnico evaluador. En cuanto a los porcentajes de acrósonas intactos a las horas 0 y 2 deberán ser de 60% y 40% respectivamente. Para evaluar la morfología espermática se emplean tinciones tales como la de eosina-nigrosina o también es posible hacerlo mediante el montaje de una placa húmeda; una muestra aceptable debería tener al menos el 70% de espermatozoides normales, con no más de un 15 a 20% de anomalías no compensables (vacuolas nucleares, cabezas piriformes); si una tinción de eosina-nigrosina hace evidente la existencia de vacuolas en el núcleo, se aconseja realizar una tinción de Feulgen con el propósito de detectar vacuolas y condensación anormal del ADN. Aunque el uso de una BBSE puede identificar de manera general la incapacidad reproductiva de los toros, la BBSE no puede establecer de forma consistente entre los toros clasificados como REPRODUCTOR POTENCIAL SATISFACTORIO (38). En consecuencia los toros que están dentro de los estándares mínimos, pueden incidir sobre los índices de preñez, presentándose diferencias del 20 al 25% ya sea mediante el uso de monta natural o IA (39).

7. Variación en la fertilidad del toro y estrategias para minimizar las consecuencias sobre la eficiencia reproductiva a nivel del rebaño

Diversos autores han concluido que el efecto de los toros sobre la fertilidad de los rebaños es mayor al causado por las vacas, posiblemente esto se deba al uso generalizado de la monta natural y a la no implementación de BBSE. Cuando se toman en cuenta los conceptos de anormalidades compensables y no compensables, es posible incrementar la fertilidad mediante el aumento de la dosis inseminante (36, 45,45). Las características compensables para la fertilidad de un toro pueden ser compensadas mediante el aumento de la dosis inseminante (cantidad de espermatozoides por pajuela), mediante el uso de este concepto se asume que una cantidad mínima de espermatozoides competentes (movilidad aceptable, morfología normal, habilidad para iniciar y experimentar reacción acrosómica es necesaria para alcanzar la fecundación normal. Por lo tanto aun si una dosis inseminante contiene espermatozoides anormales, se podrá aumentar la cantidad de espermatozoides competentes, con el objetivo de mejorar la capacidad de fertilización, siempre y cuando las anormalidades sean de tipo compensable. Sin embargo la infertilidad causada por anormalidades no compensables, no puede ser superada mediante el aumento de la cantidad de espermatozoides, ya que las deficiencias espermáticas de este tipo, derivan en fallas al momento de la fertilización y en incapacidad para sostener el desarrollo del embrión (40). Por ejemplo, si la dosis inseminante contiene una gran proporción de espermatozoides con ADN anormal, este tipo de células tienen la capacidad de alcanzar el sitio de la fertilización e iniciar el bloqueo a la poliespermia, pero se infiere que aumentar el número de espermatozoides no mejorara la capacidad fecundante del semen ya que el contenido de células anormales aumentara y la oportunidad de interacción con el oocito permanecerá igual. Con el propósito de descartar las muestras de calidad deficiente, la industria de la IA implementa medidas estrictas, para la evaluación de las anormalidades compensables y no compensables (36). La siguiente sección aborda una serie de pruebas de diagnóstico avanzadas, las cuales permiten aumentar la habilidad para evaluar, las características compensables y no compensables, aun en aquellas muestras que aparentan ser normales, ya que esta clase de muestras pueden afectar diferentes etapas de la fertilización y el desarrollo del embrión.

8. Pruebas avanzadas para predecir fertilidad

8.1 Análisis espermático asistido por computadora

Este tipo de sistema permite la evaluación objetiva de varias características cinéticas de los espermatozoides. A medida que un espermatozoide se desplaza, el sistema determina: movilidad, velocidad, linealidad y desplazamiento lateral de la cabeza entre otras características. A la fecha se reconoce ampliamente la relación de la movilidad progresiva con la fertilidad a nivel de campo (46,47). Diversos estudios de comparación, confrontando los valores cinéticos de toros de baja fertilidad *versus* toros de alta fertilidad, encontraron que los espermatozoides post-descongelación provenientes de toros de alta fertilidad, presentaron mayor hiperactivación y más capacidad para atravesar las barreras del tracto genital femenino alcanzando de forma eficiente el sitio de fertilización (48). Además los sistemas CASA pueden identificar sub-poblaciones de espermatozoides con características de movimiento concretas (49), esta clasificación específica del movimiento permite predecir con mayor exactitud la fertilidad de un toro.

8.2 ADN espermático

La calidad del ADN espermático es un factor determinante tanto del potencial de fertilización como de la competencia de desarrollo embrionario. Gracias a las protaminas, el ADN de las células espermáticas maduras está altamente condensado. Las diferentes aberraciones en el ADN (rompimientos de las hebras de ADN, defectos en las proteínas o en la compactación del ADN y la configuración de la cromatina) tienen la facultad de dañar la descondensación del ADN y en consecuencia afectar el desarrollo embrionario (50). El daño del ADN paterno puede llegar a ser incorporado dentro del genoma del embrión (efecto trans-generacional) (51). Para evaluar el ADN espermático se usa la tinción naranja de acridina, gracias a las propiedades meta-crómicas de esta coloración, este método se constituye en la prueba para determinar la estructura de la cromatina espermática, en varias especies incluyendo el ganado, esta prueba ha sido ampliamente relacionada con la fertilidad (52,53).

8.3 RNA espermático

Los espermatozoides maduros realizan sus funciones sin síntesis adicionales de proteínas, ya que desde un punto de vista de la transcripción, el ADN espermático se considera inactivo. Sin embargo los espermatozoides eyaculados contienen RNA mensajeros (transcritos durante la espermatogénesis), los cuales tienen roles potenciales tanto en la fertilización como en las etapas iniciales del desarrollo embrionario (54). Existen varios RNA espermáticos: ARNs contenidos en los ribosomas y las mitocondrias, ARNs de codificación en estado atípico o fragmentado, varias clases de ARNs sin capacidad de codificación (54). Este contenido de ARN tan heterogéneo podría ser usado como una huella en los análisis genómicos que evalúan la calidad seminal (integridad de la espermatogénesis y fertilidad) (55,56). Por lo tanto, un método confiable que permita evaluar el ARN espermático, podría ser una técnica útil para predecir las contribuciones que realizan los espermatozoides a la fertilización y durante las primeras etapas del desarrollo embrionario.

8.4 Epigenoma espermático

El epigenoma de un organismo, está constituido por todos aquellos cambios, que aun sin alterar la secuencia del ADN, provocan modificaciones importantes en el ADN, en la estructura de las histonas y llegan a influenciar la expresión de los genes (57). Si bien algunas causas de tipo ambiental (tóxicos, alimentos, la temperatura, etc.) no modifican la secuencia del ADN, pueden inducir cambios y llegar a afectar la compactación del ADN, interviniendo en el acceso de la maquinaria de transcripción y en consecuencia alterando la expresión de los genes. Estas modificaciones químicas incluyen cambios en las histonas (acetilación, fosforilación y metilación) y metilación del ADN (adición de grupos metilo a la citosina) la cual es considerada como una marca epigenética permanente. La evaluación de los cambios en las marcas epigenéticas y los cambios asociados al fenotipo, puede tener implicaciones en la identificación de los mecanismos a través de los cuales el epigenoma regula la fertilidad. Por ejemplo se ha reportado que la temperatura testicular elevada altera la expresión de una cohorte de proteínas, presentes en el espermatozoide de los toros (58), durante la espermatogénesis, se presentan modificaciones de origen epigenético, derivando en cambios de expresión de los genes, dichos eventos son capaces de alterar el ADN de las células germinales. Se afirma que los defectos de metilación de los genes pueden llegar a afectar la fertilidad de los toros (59). El incremento en la edad paterna se asocia,

con aumentos en la metilación global, presentándose de forma simultánea un descenso significativo, en la metilación regional lo cual puede afectar la salud de las crías (57). Por lo tanto la producción comercial de semen debe tomar precauciones en el uso de toros viejos. Los estudios de metilación del genoma son herramientas valiosas, ya que son empleados para analizar el epigenoma de los toros expuestos a tóxicos ambientales o también pueden ser incluidos para evaluar los toros destinados a una gran producción de semen.

8.5 Proteoma espermático

Las investigaciones en curso buscan identificar, las proteínas espermáticas críticas en la regulación de la fertilidad del toro, se resalta el posible uso de estas proteínas como marcadores de fertilidad. Focalizándose en los análisis de los perfiles de expresión, la proteómica podría identificar nuevos bio-marcadores de fertilidad. Ya que las proteínas definen el fenotipo de las células, los cambios que ocurren a nivel del proteoma causan diferencias en los fenotipos y pueden llegar a influir sobre características de importancia económica. La espectrometría de masas ha permitido la identificación y cuantificación de las proteínas; el uso conjunto de las técnicas de electroforesis con la espectrometría de masas ha facilitado la identificación de proteínas individuales y sus modificaciones pos-traducción. A pesar de los avances en tecnologías de proteómica, ningún método de extracción o identificación puede identificar todas las proteínas celulares, básicamente esta limitación se debe a diferencias en la dinámica y la solubilidad. El rompimiento de la célula en sus partes constituyentes mejorara el conocimiento del proteoma y localizara las proteínas intracelulares (61). Las proteínas de la superficie de los espermatozoides cambian durante los procesos de maduración en el epidídimo, capacitación y fertilización. Los análisis de proteómica permitieron obtener ~190 proteínas presentes en las balsas de membrana (acumulaciones lipídicas en la membrana), además se obtuvieron otras proteínas espermáticas que no están incluidas en las balsas de membrana (62). Un análisis proteómico completo de membranas identifico proteínas potencialmente involucradas en la unión a la zona pelúcida y su fusión posterior (63). Por otra parte el proteoma de la cola del espermatozoide ha sido ampliamente estudiado; es de gran interés la serie de datos (1049 proteínas presentes en la cola del espermatozoide del hombre), donde están incluidas varias proteínas peroxisomales (proteínas derivadas de los peroxisomas, se piensa que espermatozoides maduros carecen de estos organelos). Por otra parte en la especie humana se han reportado 403 proteínas del núcleo del espermatozoide, alrededor del 50% de estas proteínas nunca habían sido identificadas (65). En toros lecheros, la inadecuada localización y las cantidades alteradas de protamina 1, se han asociado con daños sobre la cromatina y problemas de fertilidad (66). Claramente el fraccionamiento de las células antes de los análisis proteómicos permite obtener mejores resultados.

La proteómica permite la evaluación de los estados funcionales (espermatozoides de alta o baja fertilidad), facilitando la identificación de bio-marcadores asociados a la fertilidad del ganado. Algunos estudios destinados a comparar toros de diferentes grados de fertilidad, encontraron una cohorte de proteínas con posible potencial para ser usadas como bio-marcadores de fertilidad (67,69). Por otra parte se reporto que una cohorte de proteínas espermáticas se expresaba diferencialmente (en el mismo toro) en los espermatozoides normales *versus* los anormales

(70), se concluyó que comparar espermatozoides morfológicamente normales *versus* anormales, es un modelo confiable para identificar proteínas espermáticas funcionales (marcadores de fertilidad potencial). Por ejemplo se encontró que una isoforma con función específica en el testículo (Na⁺/K⁺ATPasa o ATP1A4) se expresa diferencialmente en los espermatozoides normales *versus* anormales (58,71), y en consecuencia regula diferentes funciones espermáticas incluyendo la movilidad y la capacitación. Además se demostró que la actividad de la proteína ATP1A4 en los espermatozoides descongelados difiere entre los toros de razas cárnicas (72) y que su contenido y actividad son mayores en toros lecheros de alta fertilidad *versus* los de baja fertilidad, sugiriendo que la proteína ATP1A4 podría ser usada como un marcador de fertilidad. Aunque para la genética cárnica está disponible la selección asistida por marcadores (4), existe una necesidad creciente para desarrollar marcadores de fertilidad. Para establecer a ATP1A4 como un marcador de fertilidad, es importante desarrollar análisis genómicos completos que permitan identificar SNPs relacionados con fenotipos de proteínas específicas. Además para desarrollar estrategias eficientes de selección genética en el ganado de carne, se debe investigar la conexión entre esta proteína y las características de producción.

Un mejor entendimiento de la proteómica espermática, permitiría diseñar nuevas metodologías, para purificar el semen de los toros o para enriquecerlo con espermatozoides competentes. Por ejemplo hay una prueba de purificación de semen basada en nano-partículas, el principio elemental de este método observa que los espermatozoides defectuosos expresan la proteína ubiquitina y los espermatozoides con el acrosoma dañado presentan exposición de glicanos (73). Para aislar los espermatozoides defectuosos se pueden conjugar nano-partículas con anticuerpos (anti-ubiquitina) y aglutinina de maní (este complejo se unirá a los glicanos del acrosoma). Aproximadamente el 80% de los toros son clasificados como satisfactorios, sin embargo la fertilidad varía entre estos toros. En consecuencia cuando se complementa la BBSE tradicional con pruebas de laboratorio adicionales, se mejorará la fertilidad y productividad del rebaño y por ende la rentabilidad.

9. Actualización sobre semen sexado

9.1 Historia y metodología

Desde hace 2500 años se ha expresado el interés por la selección del género (74). La industria lechera necesita hembras para la producción y toros como futuros reproductores. En la industria de la carne se prefieren los machos para producción ya que estos presentan una mayor eficiencia alimenticia una razón de grasa-musculo más adecuada (75). Para los interesados existen varias revisiones sobre las perspectivas históricas, procedimientos, y fertilidad del semen sexado (74,78). Aunque diferentes enfoques fueron abordados, la selección de género únicamente fue alcanzada mediante el uso de citometría de flujo. Los espermatozoides de toro con carga X contienen 4.2% más de ADN con respecto a los de carga Y (77,79). El contenido de ADN de cada espermatozoide es medido individualmente, los espermatozoides de carga X y Y son sometidos a cargas positivas y negativas respectivamente, esto permite clasificarlos en un campo eléctrico. Sin embargo más del 75% de los espermatozoides son descartados durante el proceso de clasificación (78). Además como el proceso de clasificación es relativamente pobre, una dosis de semen sexado contiene

únicamente $\sim 2 \times 10^6$ espermatozoides. En USA se venden aproximadamente 2×10^6 dosis de semen sexado de ganado lechero y de carne, esta cantidad corresponde al 5% de las ventas totales de semen sexado (78).

9.2 Fertilidad

En novillas Holstein inseminadas con semen sexado sus tasas de concepción (39% a 45%) fueron menores que las alcanzadas mediante el uso de semen convencional (56%). En vacas lecheras se presenta también esta disminución en las tasas de concepción, presentándose un 25% de índice de concepción con el uso de semen frente a un 30% con semen convencional (77). Lo anterior es consistente con lo hallado por investigaciones donde se uso semen sexado y convencional proveniente de los mismos toros con reportes en los cuales se expone que las tasas de preñez alcanzadas por el semen sexado corresponden $\sim 70\%$ al 90% de lo registrado cuando se emplea semen convencional; además en ganado Nelore también se presenta esta reducción en las tasas de preñez, presentándose con semen sexado un 39% frente a un 58% de índice de preñez al usar semen convencional (80). La producción de embriones, a partir de ganado súper ovulado inseminado con semen sexado, presenta disminución frente al uso de semen convencional, observando esta dificultad se ha sugerido practicar la técnica de inseminación profunda (77).

Se asume que la fertilidad del semen sexado, es menor dado que es empacado a bajas concentraciones, además de tener reducida la viabilidad de las membranas espermáticas. Dado que se asegura que los espermatozoides presentes en un eyaculado son heterogéneos en términos de estructura, función y fisiología, cualquier alteración en esta heterogeneidad debida a manipulaciones *in vitro* incluyendo el sexado pueden reducir la fertilidad (81). Las pajuelas de semen sexado deben ser descongeladas a una temperatura de 35°C a 37°C durante 30 segundos, la inseminación debe realizarse 10 minutos después de descongelada la pajuela, finalmente las vacas o novillas que vayan a ser inseminadas con semen sexado lo deberán ser ~ 18 horas después del comienzo del estro (74).

9.3 Aplicaciones del semen sexado en producción de carne

La decisión de usar semen sexado en un rebaño debe basarse en el valor de los terneros sexados y en las prácticas de manejo. En la industria lechera se usa semen sexado dependiendo de la necesidad de terneros de ambos sexos. En cuanto a las razas de carne puras, se usa semen sexado para producir un gran número de hijos de algún toro sobresaliente o para obtener hijas de una línea materna superior. El uso conjunto de semen sexado con IVF aumenta es un procedimiento eficiente. Si el semen sexado no está disponible, es posible sexar el semen convencional descongelado (78, 82, 83), los embriones producidos de esta forma resultan en una tasa de preñez aceptable (40%). Cuando se usa semen sexado, varios factores afectan la eficiencia de la IVF. El semen sexado a una presión de 40 psi y con una concentración de 1×10^6 espermatozoides por mL, produce mayores tasas de clivaje y producción de blastocitos, en comparación con el semen sexado a más alta presión y con menor cantidad de espermatozoides por mL (84). Por otra parte los blastocitos resultantes de espermatozoides con carga Y tienen mayor calidad en comparación con los producidos a partir de espermatozoides con carga X. Cuando se usa semen sexado para fertilizar oocitos de vacas *Bos taurus* puras o sintéticas *Bos taurus*/*Bos indicus* la competencia en

el desarrollo embrionario se ve reducida en comparación con vacas *Bos indicus* localizadas en regiones tropicales o sub-tropicales (85).

El semen sexado puede ser usado en la producción de carne sin mantener un rebaño de vacas. Bajo este sistema de producción, una vez han producido una ternera de remplazo, todas las hembras son sacrificadas a los 30 meses de edad. Este sistema de producción intensiva requiere que las terneras crezcan a una tasa óptima, alcancen la pubertad de forma temprana y den a luz una cría hembra, la cual puede ser destetada a los 3 o 4 meses de edad, mientras la madre es engordada por 3 o 4 meses y sacrificada antes de los 30 meses de edad (74). Sistemas productivos de estas características aparecieron para incrementar la rentabilidad, el punto clave es la disminución de los costos asociados a la nutrición, ya que aproximadamente el 50% de los costos nutricionales en un sistema tradicional de producción carne, se asocian con el mantenimiento de las vacas (86). Con el objetivo de producir carne también es posible la utilización de semen sexado proveniente de toros sintéticos en vacas lecheras (78). Finalmente aunque el uso de semen sexado en la producción de carne es de alcance limitado, el uso de esta tecnología podría generar nuevas prácticas de manejo por parte de los productores (87).

9.4 Perspectivas del semen sexado

Aunque la tecnología actual para sexar el semen tiene varias dificultades, es el único procedimiento confiable y comercialmente disponible. La separación de espermatozoides basándose en la masa (88), los ensayos inmunológicos y la producción de espermatozoides transgénicos (90), son tecnologías que los investigadores han abordado, pero lamentablemente a la fecha no son de fácil aplicación. La producción comercial de embriones a través de IVF y aspiración folicular *pick up* se constituye en una práctica que permitirá mejorar el uso del semen sexado. La producción *in vitro* de embriones está aumentando a nivel mundial destacándose de manera importante en Brasil (91). Sin embargo es importante señalar que la implementación de *pick up* y semen sexado en la producción comercial de embriones, tiene que ser consistente tanto con los objetivos de los sistemas de producción, como con los tipos de ganado.

10. Conclusiones

La demanda global de proteína de origen animal requiere mejorar la eficiencia en la producción, en ese sentido el mejoramiento en la reproducción contribuye a satisfacer la demanda de estos alimentos. Actualmente se usan tanto para IA como para servicio natural toros de alto valor genético. La identificación y el uso de marcadores genómicos (con énfasis en las características de fertilidad masculina y femenina) en la selección de los toros durante sus primeras etapas de vida, es algo útil pero se debe entender muy bien, el desarrollo de los toros y los efectos de la nutrición. La realización de BBSE sistemáticos o las evaluaciones de semen congelado, permite identificar que toros tienen anomalías importantes y garantiza que los centros de IA produzcan semen de calidad certificada. Sin embargo las variaciones que se presentan en la fertilidad en diferentes toros y muestras de semen congelado, hace imperativo el uso de pruebas que permitan evaluar de manera específica las funciones de los espermatozoides. La valoración precisa de las muestras de semen, trae como consecuencia que los programas reproductivos no incluyan toros o pajuelas de baja fertilidad, además por otra parte estos análisis minuciosos, se usan para ajustar las dosis

inseminantes y maximizar la venta del semen de los mejores toros. La fertilidad no puede ser estudiada por una sola prueba ya está influenciada por una multitud de factores. En ese sentido es importante una combinación de pruebas de fertilidad, que permitan evaluar de forma específica, las características espermáticas compensables y no compensables (habilidad del espermatozoide para atravesar el tracto reproductivo femenino y alcanzar el sitio de la fertilización, experimentación de capacitación exitosa, unión a un oocito, reacción acrosómica eficaz, penetración de la zona pelúcida, fusión con la membrana plasmática del oocito, bloqueo a la poliespermia, reanudación de la meiosis del oocito mediante la liberación de factores espermáticos, des-condensación del ADN y formación de un pro-núcleo masculino, fusión con el pro-núcleo femenino, inicio del clivaje, contribución efectiva a la expresión génica que permita soportar el desarrollo de los embriones) (31).

Aunque una evaluación demasiado detallada, está lejos del alcance de las clínicas veterinarias o de los centros de IA, estos servicios si podrían ser suministrados por laboratorios especializados en andrología. Las tecnologías del semen sexado y la producción de embriones en laboratorio han facilitado el uso de toros poseedores de genética superior, contribuyendo a cumplir los objetivos en los sistemas de producción de carne. La selección de toros de genética superior, puede asegurar el desarrollo reproductivo a través de, prácticas de manejo adecuadas, control de la calidad seminal, utilización adecuada del semen (convencional o sexado), todo ello buscando mejorar la productividad animal y la producción global de alimentos.

Referencias

- [1] Lamb GC, Dilorenzo N. *Advances in experimental medicine and biology (Current and Future Reproductive Technologies and World Food Production)*. New York: Springer; 2014.
- [2] Senger PL. *Pathways to pregnancy and parturition*. Third edition. Oregon: Current Conceptions Inc.; 2012.
- [3] Engelken T, Trejo C, Voss K. Reproductive health programs for beef herds: analysis of records for assessment of reproductive performance. In: Youngquist RS, Threlfall WR, editors. *Large animal Theriogenology*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 490–6.
- [4] Schaeffer LR. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J Anim Breed Genet* 2006;123:218–23.
- [5] Neves HH, Carvalheiro R, O'Brien AM, Utsunomiya YT, do Carmo AS, Schenkel FS, et al. Accuracy of genomic predictions in *Bos indicus* (Nelore) cattle. *Genet Sel Evol* 2014;46:17.
- [6] Calus MPL, de Haas Y, Veerkamp RF. Combining cow and bull reference populations to increase accuracy of genomic prediction and genome-wide association studies. *J Dairy Sci* 2013;96:6703–15.
- [7] Berry DP, Wall E, Pryce JE. Genetics and genomics of reproductive performance in dairy and beef cattle. *Animal* 2014;8:105–21.

- [8] Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 2001;157:1819–29.
- [9] Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME. Invited review: genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *J Dairy Sci* 2009;92:433–43.
- [10] Fortes MR, Deatley KL, Lehnert SA, Burns BM, Reverter A, Hawken RJ, et al. Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: advances from microsatellites to high density chips and beyond. *Anim Reprod Sci* 2013;141:1–19.
- [11] Utsunomiya YT, Carmo AS, Neves HH, Carvalheiro R, Matos MC, Zavarez LB, et al. Genome-wide mapping of loci explaining variance in scrotal circumference in Nelore cattle. *PLoS One* 2014;9:e88561.
- [12] Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. Prepuberal behavior and pubertal characteristics of beef bulls on high nutrition allowance. *J Anim Sci* 1965;24:761–5.
- [13] Lunstra DD, Ford JJ, Echternkamp SE. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J Anim Sci* 1978;46:1054–62.
- [14] Walker WH, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 2005;130:15–28.
- [15] Walker WH. Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2010;365:1557–69.
- [16] Amann RP, Walker OA. Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. *J Anim Sci* 1983;57: 433–42.
- [17] Evans AF, Nasser DL, Bowman P, Rawlings N. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. *Theriogenology* 1995;43:569–78.
- [18] Rawlings NC, Evans ACO, Chandolia RK, Bagu ET. Sexual maturation in the bull. *Reprod Domest Anim* 2008;43:295–301.
- [19] Barth AD, Brito LFC, Kastelic JP. The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology* 2008;70:485–94.
- [20] Brito LF, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews Jr DH, Boisclair YR, et al. Effect of feed restriction during calthood on serum concentration of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone and on sexual development in bulls. *Reproduction* 2007;134:171–81.
- [21] Brito LF, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews Jr DH, Mir PS, et al. Effect of improved nutrition during calthood on serum metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular development in bulls. *Domest Anim Endocrinol* 2007;33: 460–9.

- [22] Dance A, Thundathil J, Wilde R, Blondin P, Kastelic J. Enhanced early-life nutrition promotes hormone production and reproductive development in Holstein bulls. *J Dairy Sci* 2015;98:987–98.
- [23] Bezerra LR, Sarmiento JL, Neto SG, de Paula NR, Oliveira RL, do Rego WM. Residual feed intake: a nutritional tool for genetic improvement. *Trop Anim Health Prod* 2013;45:1649–61.
- [24] Awda BJ, Miller SP, Montanholi YR, Vander Voort G, Caldwell T, Buhr MM, et al. The relationship between feed efficiency traits and fertility in young beef bulls. *Can J Anim Sci* 2013;93:185–92.
- [25] Burns BM, Gazzola C, Holroyd RG, Crisp J, McGowan MR. Male reproductive traits and their relationship to reproductive traits in their female progeny: a systematic review. *Reprod Dom Anim* 2011; 46:534–53.
- [26] Mackinnon MJ, Hetzel DJS, Corbet NJ, Bryan RP, Dixon R. Correlated responses to selection for cow fertility in a tropical beef herd. *Anim Prod* 1990;50:417–24.
- [27] Terakado AP, Boligon AA, Baldi F, Silva JA, Albuquerque LG. Genetic associations between scrotal circumference and female reproductive traits in Nelore cattle. *J Anim Sci* 2015;93:2706–13.
- [28] Moura AA, Erickson BH. Age-related changes in peripheral hormone concentrations and their relationships with testes size and number of Sertoli and germ cells in yearling beef bulls. *J Reprod Fertil* 1997; 111:183–90.
- [29] Aravindakshan JP, Honaramooz A, Bartlewski PM, Beard AP, Pierson RA, Rawlings NC. Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. *Theriogenology* 2000;54: 339–54.
- [30] Post TB, Christensen HR, Seifert GW. Reproductive performance and productive traits of beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. *Theriogenology* 1987;27:317–28.
- [31] Thundathil J, Rajamanickam G, Kastelic J. The association between sperm function and field fertility in bulls. *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology (Bull Seminar)* 2014. p. 44–55.
- [32] Barth AD. Evaluation of potential breeding soundness. In: Youngquist RS, Threlfall WR, editors. *Current therapy in large animal Theriogenology*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 228–40.
- [33] Hering DM, Olenski K, Kaminski S. Genome-wide association study for poor sperm motility in Holstein-Friesian bulls. *Anim Reprod Sci* 2014;146:89–97.
- [34] Hering DM, Olenski K, Ru_s_c A, Kaminski S. Genome-wide association study for semen volume and total number of sperm in Holstein- Friesian bulls. *Anim Reprod Sci* 2014;151:126–30.
- [35] Suchocki T, Szyda J. Genome-wide association study for semen production traits in Holstein-Friesian bulls. *J Dairy Sci* 2015;98: 5774–80.

- [36] Dalton JC. Management and insemination-related factors affecting fertilization rate in cattle. In: Proc Appl Reprod Strategies Beef Cattle. Davis, CA: Beef Reproduction Task Force; 2015. p. 176–92.
- [37] Barth A. Evaluation of frozen bovine semen by the veterinary practitioner. In: Theriogenology Handbook. Montgomery, AL: Society for Theriogenology; 1993B-9.
- [38] Kastelic JP, Thundathil JC. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim* 2008;43(Suppl 2):368–73.
- [39] Larson JL, Miller DJ. Can relative spermatozoal galactosyltransferase activity be predictive of dairy bull fertility? *J Dairy Sci* 2000;83: 2473–9.
- [40] Flowers WL. Sperm characteristics that limit success of fertilization. *J Anim Sci* 2013;91:3022–9.
- [41] Salisbury GW, Vandermark NL. Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle. First edition. San Francisco: Freeman and Co.; 1961.
- [42] Saacke RG, Nadir S, Nebel L. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. *Theriogenology* 1994;41:45–50.
- [43] Den Daas JH, DeJong G, Lansbergen LM, Van Wagtendonk-De Leeuw AM. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J Dairy Sci* 1998;81:1714–23.
- [44] Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:663–77.
- [45] Braundmeier AG, Miller DJ. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J Dairy Sci* 2001;84:1915–25.
- [46] Gillan L, Kroetsch T, Maxwell WM, Evans G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim Reprod Sci* 2008;103:201–14.
- [47] Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim Reprod Sci* 2008;104:9–17.
- [48] Shojaei H, Kroetsch T, Wilde R, Blondin P, Kastelic JP, Thundathil JC. 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* 2012;77:940–51.
- [49] Muino R, Tamargo C, Hidalgo CO, Pena AI. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci* 2008;109:27–39.

- [50] Johnson KM. Fertility clinic, egg donation agency, and sperm bank policies. *Fertil Steril* 2011;96:877–9.
- [51] Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum Mol Genet* 2009;18:3769–78.
- [52] Ballachey BE, Evenson DP, Saacke RG. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J Androl* 1988;9:109–15.
- [53] Karabinus DS, Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Kaproth MT. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J Dairy Sci* 1990;73:2364–71.
- [54] Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive medicine network. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update* 2013;19:604–24.
- [55] Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;360:772–7.
- [56] Kasimanickam V, Kasimanickam R, Arangasamy A, Saberivand A, Stevenson JS, Kastelic JP. Association between mRNA abundance of functional sperm function proteins and fertility of holstein bulls. *Theriogenology* 2012;78:2007–19.
- [57] Jenkins TG, Aston KI, Meyer T, Carrell DT. The sperm epigenome, male aging, and potential effects on the embryo. *Adv Exp Med Biol* 2015;868:81–93.
- [58] Newton LD, Kastelic JP, Wong B, van der Hoorn F, Thundathil J. Elevated testicular temperature modulates expression patterns of sperm proteins in Holstein bulls. *Mol Reprod Dev* 2009;76:109–18.
- [59] Verma A, Rajput S, De S, Kumar R, Chakravarty AK, Datta TK. Genome-wide profiling of sperm DNA methylation in relation to buffalo (*Bubalus bubalis*) bull fertility. *Theriogenology* 2014;82:750–9.
- [60] Shojaei Saadi HA, O’Doherty AM, Gagne D, Fournier E, Grant JR, Sirard MA, et al. An integrated platform for bovine DNA methylome analysis suitable for small samples. *BMC Genomics* 2014;15:451.
- [61] Brewis IA, Gadella BM. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod* 2010;16:68–79.
- [62] Asano A, Nelson JL, Zhang S, Travis AJ. Characterization of the proteomes associating with three distinct membrane raft sub-types in murine sperm. *Proteomics* 2010;10:3494–505.
- [63] Nixon B, Mitchell LA, Anderson AL, McLaughlin EA, O’bryan MK, Aitken RJ. Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes. *J Cell Physiol* 2011;226:2651–65.

- [64] Amaral A, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Ramalho-Santos J, Oliva R. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Mol Cell Proteomics* 2013;12:330–42.
- [65] De Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics* 2011;11: 2714–26.
- [66] Dogan S, Vargovic P, Oliveira R, Belser LE, Kaya A, Moura A, et al. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biol Reprod* 2015;92:1–9.
- [67] Gerena RL, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin synthase. *Biol Reprod* 1998;58:826–33.
- [68] D'Amours O, Frenette G, Fortier M, Leclerc P, Sullivan R. Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction* 2010;139:545–56.
- [69] Peddinti D, Nanduri B, Kaya A, Feugang JM, Burgess SC, Memili E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst Biol* 2008;2:19.
- [70] Shojaei Saadi HA, van Riemsdijk E, Dance AL, Rajamanickam GD, Kastelic JP, Thundathil JC. Proteins associated with critical sperm functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. *J Proteomics* 2013;82:64–80.
- [71] Newton LD, Krishnakumar S, Menon AG, Kastelic JP, van der Hoorn FA, Thundathil JC. Nap/KpATPase regulates sperm capacitation through a mechanism involving kinases and redistribution of its testis-specific isoform. *Mol Reprod Dev* 2010;77:136–48.
- [72] Rajamanickam G, Dance A, Thundathil J. Frozen-thawed sperm from beef bulls differ in their Nap/KpATPase activity. *Proc Annual Meeting Soc for Study of Reprod* 2011;4:67.
- [73] Odhiambo JF, DeJarnette JM, Geary TW, Kennedy CE, Suarez SS, Sutovsky M, et al. Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. *Biol Reprod* 2014;91:97.
- [74] Seidel Jr GE. Application of sex-selected semen in heifer development and breeding programs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2013;29:619–25.
- [75] Espinosa-Cervantes R, Córdova-Izquierdo A. Sexing sperm of domestic animals. *Trop Anim Health Prod* 2013;45:1–8.
- [76] Garner DL, Seidel Jr GE. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 2008;69:886–95.
- [77] Hansen PJ. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. In: Lamb GC, DiLorenzo N, editors. *Current and future reproductive technologies and world food production*. New York: Springer; 2014. p. 1–22.

- [78] Seidel Jr GE. Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 2014;8:160–4.
- [79] Moruzzi JF. Selecting a mammalian species for the separation of X and Y-chromosome-bearing spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1979;57: 319–23.
- [80] Dominguez JH, Costa DS, Centurion VJ, Faria FJ. Pregnancy rate of Nelore females inseminated with male-sexed semen. *Anim Reprod Sci* 2011;129:127–31.
- [81] Vishwanath R. Sexed sperm vs conventional sperm—a comparative discussion. In: *Proc Appl Reprod Strat beef cattle 2015*. p. 250–6. Davis, CA.
- [82] Puglisi R, Vanni R, Galli A, Balduzzi D, Parati K, Bongioni G, et al. In vitro fertilization with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction* 2006;132:519–26.
- [83] Morotti F, Sanches BV, Pontes JH, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, et al. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 2014;81:696–701.
- [84] Barceló-Fimbres M, Campos-Chillón LF, Seidel Jr GE. In vitro fertilization using non-sexed and sexed bovine sperm: sperm concentration, sorter pressure, and bull effects. *Reprod Domest Anim* 2011; 46:495–502.
- [85] Lopez WO, Alvis-Miranda HR, Gamarra AF, Rendon B, Borda DA, Albicker U, et al. Effects of sexed semen and interactive effects on commercial in vitro embryo production when oocytes are collected from cows of *Bos indicus*, and *Bos taurus* breeding and crossbred cows of these subspecies. *Anim Reprod Sci* 2015;156:58–63.
- [86] Seidel Jr GE, Whittier JC. Beef species symposium: beef production without mature cows. *J Anim Sci* 2015;93:4244–51.
- [87] Dahlen C, Larson J, Lamb GC. Impacts of reproductive technologies on beef production in the United States. In: Lamb GC, DiLorenzo N, editors. *Current and future reproductive technologies and world food production*. New York: Springer; 2013. p. 97–114.
- [88] Koundouros S, Verma P. Significant enrichment of Y-bearing chromosome human spermatozoa using a modified centrifugation technique. *Int J Androl* 2012;35:880–6.
- [89] Sang L, Yang WC, Han L, Liang AX, Hua GH, Xiong JJ, et al. An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. *J Dairy Sci* 2011;94:2060–70.
- [90] Herrmann BG, Koschorz B, Wertz K, McLaughlin KJ, Kispert A. A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance. *Nature* 1999;402:141–6.
- [91] Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Anim Reprod* 2012;9:12–8.