

# Influencia del toro en la tasa de preñez y las pérdidas por preñez en ganado de carne y leche

Fotografía cortesía: Agropecuaria Vía Láctea.

Sarah Singleton, Damon Smith, Brette Poliakiwski, Gabriela Dalmaso, Ramiro Oliveira, Odile Polanco y K. G. Pohler<sup>1</sup> Departamento de Ciencias Animales, Texas A&M University, College Station  
Ponencia presentada durante el 14 Simposio Internacional de Reproducción Animal.  
Instituto Reproducción Animal Córdoba – IRAC- Argentina 2022

La fertilidad es la capacidad de producir preñeces exitosas y es un factor complejo de importancia que se encuentra bajo mucha influencia. La mayoría de los estudios se han centrado en las contribuciones maternas y ambientales a la preñez. Pocos se han centrado en el padre y su papel en la pérdida de la preñez y, aún menos, han dilucidado las relaciones pronósticas entre la fertilidad del padre y la embriogénesis.

Las herramientas útiles para comprender mejor estas contribuciones parentales son los perfiles transcripcionales, los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) y los embriones uniparentales.

Cada vez hay más pruebas que el padre contribuye más allá del desarrollo embrionario temprano, particularmente al desarrollo de una placenta funcional y los hallazgos recientes e inéditos en el ganado pueden indicar que el genoma del padre tiene un papel más vital en la inserción del concepto endometrial en los rumiantes de lo que se creía anteriormente.

## Plasma seminal

Para fertilizar con éxito un ovocito *in vivo*, los espermatozoides deben someterse a drásticas alteraciones metabólicas y de membrana; estos eventos comienzan en el tracto reproductivo masculino y se completan en el tracto reproductivo femenino. El plasma seminal es el componente acelular del semen, que contiene una mezcla compleja de contenido hormonal, antimicrobiano, eAnzimático y otros contenidos bioquímicos que actúan como vehículo y protector para los espermatozoides (Garner y Hafez, 2000). El fluido es producido y secretado principalmente por las glándulas sexuales accesorias masculinas con variaciones aparentes entre las especies. En los últimos años, las proteínas específicas que se encuentran en el plasma seminal han sido de gran interés en su papel con respecto a la fertilidad masculina. Estas proteínas se conocen

como factores de descapacitación, y están involucradas en la capacitación espermática (Therien *et al.*, 1995), la liberación a partir del epitelio uterino junto con la hiperactivación (Ignotz *et al.*, 2001; Suarez, 2006), y la reacción acrosómica (Manjunath *et al.*, 1992), todas las cuales ocurren naturalmente en el tracto reproductivo femenino.

En el ganado bovino, las proteínas plasmáticas seminales bovinas (BSP) son producidas por las vesículas seminales y se unen a las regiones de la cabeza del esperma en la eyaculación (Desnoyers y Manjunath, 1992). Sin la eliminación de estos factores de descapacitación, la reacción acrosómica para penetrar en la zona pelúcida (ZP) no puede ocurrir, y la fertilización finalmente fallará. Otras especies, incluyendo ovejas (Maxwell *et al.*, 1999), ratones (Fraser, 1984) y humanos (Lamirande *et al.*, 1993) muestran hallazgos similares. Además, la capacitación debe ocurrir en un momento y lugar específicos para promover una fecundación exitosa. En la preparación para la inseminación artificial, una práctica comúnmente utilizada hoy en día, los espermatozoides pueden sufrir cambios drásticos de temperatura, clasificación sexual, dilución, etc., todos los cuales pueden eliminar el *plasma seminal* y alterar los factores de descapacitación unidos a la superficie externa del esperma (Maxwell *et al.*, 2007). Se cree que como resultado después de la pérdida y alteración de estos factores, la *criopreservación* ha demostrado inducir prematuramente la capacitación en el carnero (Gillan y Maxwell, 1999) y el toro (Cormier, *et al.* 1997), disminuyendo su fecundidad. Además, durante el proceso de congelación-descongelación, los espermatozoides pueden lesionarse o ser incompetentes, lo que producirá embriones inviables que finalmente fallarán o evitarán la fertilización por completo (Gillan y Maxwell, 1999). En algunas especies, como la oveja, se ha demostrado que la adición de *plasma seminal* al semen criopreservado aumenta la fertilidad y la tasa de preñez (Maxwell, *et al.* 1999).

Sin embargo, la adición experimental de *plasma seminal* ha tenido resultados contradictorios en la literatura, dependiendo de cuándo se agregó el plasma seminal en conjunto con estudios de criopreservación y dónde se depositó el semen, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Estos efectos negativos sobre la calidad y la fertilidad de los espermatozoides son probablemente compensables, ya que un aumento en el número de espermatozoides puede compensar teóricamente los resultados adversos. Para aumentar nuestra tasa de preñez con las tecnologías de reproducción asistida, se justifica una investigación adicional sobre el plasma seminal y sus efectos específicos en cada especie.

## Análisis fenotípico de esperma y evaluación de fertilidad

Quizás las contribuciones más analizadas del macho y su subfertilidad/esterilidad asociada son defectos en los espermatozoides. Como se indicó anteriormente, para que los espermatozoides penetren y fertilicen con éxito un ovocito, deben completar la capacitación, unirse a la zona pelúcida (ZP) del ovocito y someterse a la reacción del acrosoma. Estas no son tareas fáciles y se ha demostrado que las alteraciones en la forma del esperma, el movimiento o la estructura cromosómica afectan negativamente estos eventos, así como la viabilidad de un embrión en desarrollo. Una estimación de la fertilidad masculina comúnmente utilizada es una inspección visual de los espermatozoides para detectar anomalías en un análisis de semen. Los aspectos analizados incluyen morfología y motilidad. La *morfología* se refiere a la estructura de un espermatozoide y la *motilidad* se refiere a la capacidad del espermatozoide para progresar en un movimiento hacia adelante; ambos son esenciales para la fertilización de un ovocito *in vivo*. Estos son análisis comunes y se utilizan en exámenes de capacidad de cría (*breeding soundness*

exams, BSEs) de ganado macho (para obtener más información sobre los BSEs, consulte los parámetros actualizados de la Sociedad Americana de Teriogenología). Sin embargo, la evaluación estándar del semen no puede tener en cuenta otras capacidades funcionales y fertilizantes del esperma (Cheung et al., 2019). Los parámetros más intensivos implican la utilización del recuento de espermatozoides accesorios, definido como el número de espermatozoides que permanecen dentro de la zona pelúcida endurecida (ZP) después de la fertilización de mamíferos (De Jarnette et al., 1992), y la tasa de fertilización (FR). La tasa de fertilización se ha calculado como la proporción de embriones clivados ~48 h después de la fertilización *in vitro* (FIV) con respecto al número total de ovocitos expuestos (Khatib et al., 2009). La tasa de fertilización es una herramienta útil para determinar la competencia de un padre para fertilizar un ovocito; sin embargo, esta tasa no es una descripción precisa de la fertilidad en sí. Un estudio reciente mostró que los toros de alta y baja fertilidad tienen diferencias insignificantes entre sus tasas de fertilización, incluso cuando la fertilidad a campo de los padres contabilizados mostró diferencias significativas (O'Callaghan et al., 2021). Por otro lado, al evaluar el recuento de espermatozoides accesorios y el grado de desarrollo, los toros de alta fertilidad mencionados anteriormente tuvieron un mayor número de espermatozoides accesorios, así como etapas posteriores de desarrollo en los embriones. Un mayor número de espermatozoides accesorios está positivamente relacionado con la fertilización y/o la calidad del embrión, y las etapas posteriores del desarrollo aluden a la competencia en el desarrollo, así como a la calidad de un embrión (DeJarnette et al., 1992). Esta evidencia sugiere que la competencia para fertilizar un ovocito no es una buena estimación de la fertilidad, ya que la fertilización no parece ser el problema para estos padres subfértiles. El análisis de semen estándar, aunque

útil para identificar a la mayoría de los individuos infértiles, tiene una profunda deficiencia. No puede identificar errores genéticos.

La *meiosis* es el proceso de crear gametos haploides, cuatro células hijas. En los machos, este evento, conocido como espermatogénesis, tiene lugar dentro de los testículos. La espermatogénesis alterada puede causar anomalías cromosómicas profundas, en forma de errores meióticos, que probablemente conducen a la pérdida embrionaria; sin embargo, estas asociaciones rara vez se registran en especies ganaderas. En 2019, se realizó un estudio utilizando 2 grupos de hombres humanos con pérdida recurrente de la preñez, un grupo que tuvo éxito eventual logrando preñeces con tecnologías de reproducción asistida (ART; fértil) y otro que no (infértil). Todos los hombres tuvieron un análisis de semen relativamente normal. Utilizando la secuenciación de próxima generación (NGS) para evaluar los defectos cromosómicos, los resultados mostraron que ambos grupos de estos hombres compartían un aumento en la aneuploidía espermática, tanto en los cromosomas sexuales como en los cromosomas autosómicos, así como otras anomalías genéticas (Cheung et al., 2019). Curiosamente, Cheung y otros reportaron que el grupo infértil tenía una mayor incidencia de aneuploidía en los espermatozoides en comparación con el grupo fértil de hombres. Además, el grupo infértil fue capaz de fertilizar ovocitos que se desarrollan hasta la etapa de implantación, pero que finalmente resultaron en pérdida. Por lo tanto, estos defectos cromosómicos compartidos sugieren que la mortalidad embrionaria recurrente puede deberse a problemas que surgen durante la espermatogénesis, y errores más profundos en los gametos haploides pueden conducir a una comunicación madre concepto fallida para una placentación exitosa. Por lo tanto, la espermatogénesis deteriorada o alterada probablemente se asocia con la subfertilidad o infertilidad masculina y se conserva en todos los mamíferos machos

## Placentogénesis

En los mamíferos euterios, la placenta es el órgano especializado más complejo que funcionará como una multitud de órganos esenciales de la cría en desarrollo en el útero (Luckett, 1975). Además, la placenta es una estructura derivada del concepto responsable del intercambio de nutrientes entre la cría y la madre, y surge de células endodérmicas del trofoblasto y extraembrionarias en el embrión temprano. Estas son las primeras células que sufrirán especificación después de la fertilización; se cree que esto ocurre porque el establecimiento y la funcionalidad de la membrana placentaria es fundamental en las primeras etapas de la preñez (Cross, 1998). Sin una placenta que se desarrolla y funciona temprano, una preñez simplemente no puede continuar.

Trabajos recientes con embriones uniparentales han comenzado a avanzar en la comprensión de la contribución específica de los padres a la placenta. En estudios en ratones que utilizaron embriones uniparentales, el genoma paterno mostró una contribución significativa a la proliferación de tejidos trofoblastos que son tejidos precursores de la placenta (Surani et al., 1984; Franco et al., 2020). Los embriones murinos partenogénicos (AP), embriones que solo contienen contribución genética materna, mostraron un crecimiento adecuado del embrión relativamente normal y un trofotodermo subdesarrollado en los tejidos conceptuales. Por el contrario, los embriones murinos androgénicos, aquellos que contienen solo contribución genética paterna, tenían un trofotodermo bien proliferado y un embrión subdesarrollado propiamente dicho (Surani et al., 1984). Estos resultados sugirieron que el papel del padre en un concepto en desarrollo se extendía más allá de la fertilización; es decir, el padre puede ser el principal contribuyente al desarrollo funcional de la placenta. Además, los datos preliminares del Pohler Lab que utilizan embriones bovinos partenogénicos

(PA) pueden ampliar esta historia en otros tipos de placenta. Los rumiantes y otras especies ganaderas utilizan una placenta sindesmocorial, mientras que los roedores y los humanos tienen una placenta hemocorial. La transferencia de embriones (TE) partenogenéticos bovinos, permitió comparaciones in vivo con preñeces biparentales. Los resultados mostraron genes expresados diferencialmente (DEG) entre los embriones partenogenéticos frente a las preñeces bovinas de control. De esos genes expresados diferencialmente DEG, los partenogenéticos PA mostraron disminuciones en los genes críticos para el mantenimiento de la preñez. Estas incluyeron actividades estructurales, reacciones de reducción-oxidación y actividades proteolíticas que involucran glicoproteínas asociadas a la preñez (PAG). Curiosamente, al día 31, el trofodermo de las preñeces de partenogenéticos era bien alargado, pero era de naturaleza rudimentaria y no tenía sitios obvios de apego. Esto sugiere además que el papel del padre va más allá de simplemente formar una placenta.

En cambio, el genoma paterno puede estar involucrado en la inserción y tal vez en el proceso de implantación en preñeces bovinas. Los estudios de TE de quimera (*agregados de blastocistos in vitro y partenogenéticos*) en ganado bovino pueden respaldar aún más la idea de que el genoma del padre juega un papel importante en el desarrollo completo de estructuras extraembrionarias, placentarias, así como en la producción de un ternero viable (*Boediono et al. 1999*). Cuando las preñeces de bovinos partenogenéticos uniparentales finalmente fallaron, la combinación de blastómeros biparentales derivados in vitro con blastómeros de partenogenéticos condujo al nacimiento vivo de terneros quiméricos. Además, *Boediono y otros* plantearon la hipótesis de que los blastómeros de FIV se asignarían al trofodermo mientras que los blastómeros de partenogenéticos darían lugar al ICM, por lo tanto, esto arrojó luz sobre la necesidad del genoma paterno en los tejidos placentarios, pero no ha surgido evidencia de apoyo desde entonces.

## Moléculas específicas de la placenta

Además de funcionar como órganos vitales para un concepto en desarrollo, la placenta, de origen predominantemente paterno, también aporta sus propios productos para promover el mantenimiento de la preñez. Estas clases de moléculas específicas de la preñez son producidas por las células gigantes del trofoblasto de la placenta y se secretan en la circulación materna durante la preñez (*Klisch et al., 2005*). En el ganado bovino, las glicoproteínas asociadas a la preñez (PAG) se expresan abundantemente en la circulación materna. Desde su descubrimiento en la década de 1980, los PAG han sido un objetivo para el diagnóstico de la preñez y la predicción de la pérdida de la preñez. En bovinos, las concentraciones relativas de PAG se utilizan comercialmente para detectar preñeces, y son marcadores indicativos de mortalidad embrionaria tardía (LEM) que comprende aproximadamente el 6% de la pérdida de preñeces en bovinos (*Pohler et al., 2016; Reese et*



Fotografía cortesía: Agropecuaria Vía Láctea.

*al.*, 2020). En preñeces bovinas con concentraciones relativamente altas de *PAG* periférico, la supervivencia embrionaria aumentó en comparación con aquellos con concentraciones más bajas (Franco *et al.*, 2018; K. Pohler *et al.*, 2016). Además, no todos los padres muestran las mismas tasas de preñez o pérdidas de preñez durante el mismo período; se cree que un componente genético está en juego con ciertos padres que están predispuestos a una disminución en los *PAG* circulantes en el día 30 en comparación con los padres de bajas pérdidas de preñez, incluso cuando la tasa de preñez inicial era prometedora entre los dos grupos (Franco *et al.*, 2018). A la fecha actual, en cuanto sabe este autor, aún no se ha determinado una línea base de *PAG* para un resultado de preñez de control en el ganado. En ovinos, los *PAG* ovinos (*ovPAG*) también se utilizan para la detección de la preñez. Además, dado que los *ovPAG* también son producidos por células trofoblásticas, las preñeces de más de un concepto se correlacionan con el aumento de la masa placentaria; por lo tanto, los *ovPAG* también se utilizan como indicadores de que una oveja tiene un solo feto o múltiples fetos (Karen *et al.*, 2006). En los tipos de placenta hemocorial (por ejemplo, primates y roedores), las glicoproteínas específicas de la preñez (*PSG*), también de origen trofoblástico, se secretan en la circulación materna. La concentración de estas glicoproteínas, como los *PAG* y los *ovPAG*, seguirá aumentando durante toda la preñez. Además, las concentraciones de *PSG* superan con creces los niveles de gonadotropina coriónica humana (*hCG*) en preñeces humanas, enfatizando aún más su importancia (Lee *et al.*, 1979). Finalmente, la función exacta de las *AGP* y sus homólogos sigue sin estar clara, pero se plantea la hipótesis de que tienen una función luteotrópica o inmunomoduladora, pero eso sigue siendo objeto de debate (Wallace *et al.*, 2015).

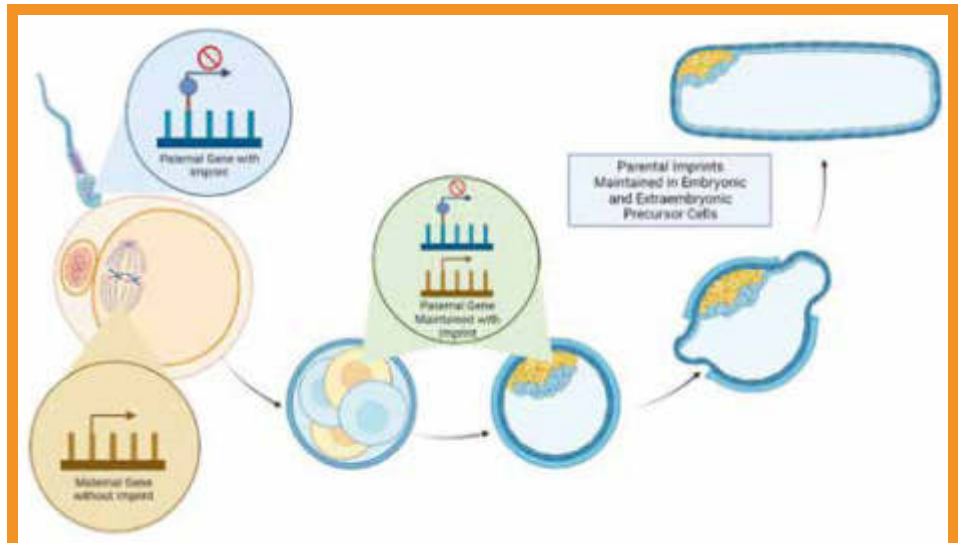


Figura 1: Impresiones genómicas de primera generación en embriones tempranos y estructuras de desarrollo derivadas de padres. La figura anterior muestra un ejemplo de un gen impreso paternalmente de primera generación. En la fecundación, el espermatozoide aporta un conjunto haploide de cromosomas con el gen impreso indicado, y el mismo gen dentro del ovocito no está impreso. El cigoto resultante conserva este estado impreso paternalmente en dicho gen y, por lo tanto, solo expresa la versión materna del gen. La masa celular interna (ICM), sombreada en amarillo, da lugar a productos de embriogénesis derivados de la maternidad, mientras que el endodermo extraembrionario (EE) y el trofoblasto (TB), sombreado arriba en azul claro y oscuro, dan lugar a productos de embriogénesis derivados de la paternidad. Eventualmente, masa celular interna (ICM) formará el embrión apropiado mientras que el EE y la TB formarán las membranas placentarias asociadas.

## Impresión genética

Los genomas parentales deben trabajar en conjunto para generar con éxito una preñez, pero el conjunto de genes de cada padre no se comporta de la misma manera en un concepto en desarrollo. En los mamíferos placentarios, la impresión genómica es un fenómeno que se cree que ha surgido para “silenciar” alelos parentales opuestos en situaciones donde la expresión bialélica podría conducir a errores de desarrollo o letalidad. Durante la embriogénesis, la expresión génica original prefiere los genes impresos expresados maternalmente que silencian la expresión paterna y los genes impresos expresados paternalmente que silencian la expresión materna. Ocurren dos etapas de imprinting. La primera de ellas ocurre en la fecundación (*huellas de primera generación*) y se mantiene durante toda la vida del individuo, pero el borrado y la reprogramación se producen en las gónadas de ese individuo in utero (*huellas de*

*segunda generación*), determinadas por su sexo (para su revisión, ver Elbracht *et al.*, 2020; Johnson *et al.*, 1984; Seki *et al.*, 2005; Hajkova *et al.*, 2002). Por qué la evolución ha favorecido la expresión monoalélica sobre la bialélica todavía está en debate, pero está claro que los genes que han tenido un imprinting exitoso son necesarios para el desarrollo (Surani *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1984; Barton *et al.*, 1984). La mayoría de las huellas genéticas identificadas se han asociado con la embriogénesis, y la mayoría de las identificadas en el ganado y otras especies se encuentran dentro de la placenta, un órgano prenatal vital de fuerte influencia paterna (Barton *et al.*, 1984; Surani *et al.*, 1984). Por lo tanto, si se produce una falla u otro error durante el imprinting genómico en los gametos de un individuo, es probable que se produzcan consecuencias perjudiciales.

Como se indicó anteriormente, se cree que los embriones uniparentales fallan debido a la impresión genómica

Fotografía cortesía: Agropecuaria Vía Láctea.



fallida. Al inspeccionar los conceptos partenogenéticos de roedores, los estudios en 1984 observaron embriones anormales y estructuras placentarias asociadas con retraso del crecimiento (Surani et al., 1984; Barton et al., 1984). El fracaso en esta etapa crítica no suele ser permisivo por naturaleza, ya que se cree que la mayoría, si no todas, las huellas genómicas fallidas de primera generación están asociadas con errores de desarrollo y letalidad (Johnson et al., 1984). Por lo tanto, es razonable sugerir que la falla prenatal con respecto a la impresión genómica en el macho puede ser un factor causante de la mortalidad embrionaria en el ganado y otros mamíferos placentarios.

Los genomas parentales no son equivalentes; ambos deben desempeñar papeles individuales fundamentales en la generación natural de descendencia. El genoma paterno debe estar presente y estar impreso con éxito para garantizar que se puedan dar pasos críticos en el desarrollo. De lo contrario, la pérdida embrionaria es probablemente el resultado. La importancia del genoma paterno a

menudo se pasa por alto y se subestima. Esto ha llevado a una información abrumadora sobre el papel paterno en las preñeces exitosas. Además, existe una información muy limitada con respecto a los genes impresos en especies ganaderas.

En la actualidad, se han identificado ~274 genes impresos en humanos y ~178 en ratones, mientras que solo ~50 y ~31 se han identificado en bovinos y ovinos, respectivamente (para obtener la lista extensa, consulte [www.geneimprint.com](http://www.geneimprint.com)). Con la creciente evidencia de roles específicos de los padres a nivel genético en especies de mamíferos, se debe dirigir más atención hacia el genoma paterno para comprender mejor la contribución del padre al desarrollo y pérdida del concepto. Conclusión La predicción de la fertilidad masculina es un esfuerzo constante de la industria de ganadería de vacunos de carne en todo el mundo. El desarrollo de técnicas *in vitro* para predecir con precisión la fertilidad en el campo tendría un impacto importante en el aumento de la eficiencia reproductiva general en todas las especies. En esta

revisión discutimos los aspectos importantes a considerar con respecto a los efectos del padre en el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Es importante darse cuenta de que incluso cuando los espermatozoides visualmente parecen poseer todos los rasgos necesarios para una fecundación exitosa, todavía existen diferencias importantes, enfatizando la necesidad de una mejor comprensión de los factores espermáticos moleculares y genéticos, así como la forma en que los espermatozoides interactúan con el tracto reproductivo femenino después de la inseminación. Otro punto clave es que el padre contribuye significativamente a la pérdida de la preñez, lo cual no debe ignorarse al medir la fertilidad. Explorar esta relación puede ayudar a comprender las causas de las pérdidas de preñez, así como desarrollar una herramienta para identificar y seleccionar padres de mayor fertilidad. 6

Referencias bibliográficas disponibles en: [geneticabovina.fer@gmail.com](mailto:geneticabovina.fer@gmail.com)