

Artículo de Revisión/Review Article

EFFECTO MACHO EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO MALE EFFECT IN EMBRYONIC DEVELOPMENT

Francisco Báez Contreras*, Patricia Villamediana Monreal

Laboratorio de Citogenética. Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

*La correspondencia debe dirigirse a (Correspondence should be addressed to) F. Báez Contreras; email: franciscobaez81@gmail.com

RESUMEN

Las pérdidas tempranas de gestaciones son la causa más frecuente del fracaso de los sistemas de producción agropecuarios. Esta pérdida está relacionada con la pobre capacidad de desarrollo y calidad de los embriones. Se creía que la mortalidad embrionaria en mamíferos estaba estrechamente relacionada con el factor de infertilidad en la hembra y que el macho sólo se limitaba a aportar el material genético para el nuevo individuo y donación de los centrosomas. Existen cada vez más evidencias, que relacionan esta mortalidad con anomalías en el espermatozoide que incluyen el estado de la cromatina, anomalías cromosómicas, agentes ambientales e infecciosos, que al momento de la fecundación pueden afectar la supervivencia embrionaria. Sin embargo, en muchos casos, las anomalías detectadas corresponden a un síntoma más amplio de daños subyacentes. La conformación estructural y funcional del espermatozoide se ve influenciada por varios factores y de existir un efecto macho sobre el desarrollo normal del embrión, dicho efecto está estrechamente relacionado con la calidad espermática. Aunque los procedimientos de FIV tienen mucho éxito, el conocimiento científico actual aún está lejos de identificar todos los procesos moleculares que ocurren durante las primeras etapas de la fusión de dos gametos que dan origen a una nueva vida. En esta revisión se ofrece una descripción de los conocimientos actuales, la aplicación y los avances de las tecnologías reproductivas con el propósito de aclarar el aporte del macho sobre el desarrollo embrionario.

Palabras clave: efecto, macho, desarrollo embrionario.
JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2016) 1(1):2-12

ABSTRACT

Early pregnancy losses are the most common causes of failure in animal production systems. This loss is related to poor embryonic development potential and embryo quality. It was believed that embryo mortality in mammals was closely related to female infertility and that the male only supplied the genetic material for the new individual as well as the centrosomes. There is growing evidence that this mortality is associated with sperm abnormalities including the state of chromatin, chromosomal abnormalities, environmental and infectious agents, which can affect embryo survival at the time of fertilization. However, in many cases, the detected abnormalities represent a symptom of a wider underlying damage. The structural and functional conformation of the sperm is influenced by several factors, and if a male effect should exist on the normal development of the embryo, it would be closely related to sperm quality. Although IVF procedures are very successful, scientific knowledge is still far from complete to identify all the molecules and processes involved during the first stages of the fusion of the two gametes to bring forth a new life. In this review, an overview of the current knowledge, applications, and advancement of reproductive technologies in order to clarify the contribution of the male on embryonic development, will be presented.

Keywords: effect, male, embryonic development
JOURNAL OF VETERINARY ANDROLOGY (2016) 1(1):2-12

Recibido/Received: 29/03/2016; Aceptado/Accepted: 09/05/2106

INTRODUCCIÓN

El nacimiento de un descendiente es la última prueba para evaluar la fertilidad del padre tanto in vivo como in vitro, pero ésta exige también muchas desventajas prácticas y económicas. Algunos autores afirman la existencia de un efecto macho sobre el desarrollo embrionario, el cual afectaría la tasa de división, producción y calidad de los blastocistos (Ward et al., 2001; Kato et al., 2011; Gualtieri et al., 2014; Aston et al., 2015), por lo que la producción in vitro (PIV) de embriones puede ser una herramienta fundamental para evaluar esta situación (Anifandis et al., 2013; Gadella & Boerke, 2016; Nakai et al., 2016; Parrish, 2014; Rodríguez-Villamil et al., 2016; Vandaele et al., 2006). Sin embargo, Ohgoda et al. (1988) y Schneider et al. (1999), indican que la fertilidad in vivo del toro no se puede utilizar como indicador confiable para la tasa de división y el desarrollo in vitro del embrión, puesto que no existe ninguna correlación entre la fertilidad del toro bajo las condiciones in vitro e in vivo. El aporte del macho a la PIV de embriones se puede correlacionar con la morfología del espermatozoide y puede llegar a ser especialmente obvia en el momento de la fecundación o durante el desarrollo temprano del embrión (Vandaele et al., 2006; Chenoweth, 2005).

La PIV de embriones proporciona un recurso inestimable para el estudio del desarrollo temprano de los mamíferos y como herramienta para el desarrollo de otras disciplinas como la transgenia y transferencia nuclear (Lonergan & Fair, 2008). A pesar de haber superado muchos de las dificultades que se presentaron en sus inicios, y muchos laboratorios han sido capaces de producir eficientemente embriones in vitro (Meirelles et al., 2004), estos presentan un desarrollo y calidad más bajos que los obtenidos in vivo (Lonergan et al., 2003). Existen muchos factores que pueden interferir en el desarrollo normal del embrión, como lo son las condiciones de cultivo (Warzych et al., 2007), que se traduce en el detenimiento de la división embrionaria y el bloqueo del cuarto o quinto ciclo celular o fallas de la gestación temprana en hembras sometidas a transferencia embrionaria (TE; revisado por Meirelles et al., 2004). La falla de la gestación es el mayor gasto de los sistemas de producción pecuaria. Esta pérdida o falla está directamente relacionada con la competencia para el desarrollo de los embriones en estadio de blastocisto, y no está limitada a los bovinos sino también persiste en humanos (Chenoweth, 2007).

La razón de esta falla no está del todo clara (D'Occhio et al., 2007). Aunque, el desarrollo embrionario exitoso es dependiente de las contribuciones genéticas y epigenéticas tanto de la hembra como del macho, el potencial del efecto adverso que puede generar el macho sobre el desarrollo y calidad embrionaria es probablemente la causa más cercana para el entendimiento de esta anomalía (Chenoweth, 2007). Los avances en la PIV y TE, pueden permitir aclarar las dudas con respecto a la contribución perjudicial o beneficiosa del macho sobre el desarrollo y supervivencia embrionaria.

Muchos estudios han demostrado cómo el “efecto macho” puede causar alteraciones en los resultados obtenidos de las técnicas de reproducción asistida (ART) (Agarwal & Allamaneni, 2004; Benchaib et al., 2003; Borini et al., 2006; Januskauskas & Zilinskas, 2002; Walters et al., 2005; Ward et al., 2001). Varios autores han demostrado como este “efecto macho” puede ser relacionado nuevamente con anomalías en la organización cromosómica del espermatozoide. Los espermatozoides humanos subfértiles o comprometidos se caracterizan por susceptibilidad a la desnaturalización ácido-inducida in situ (Spanó et al., 2000), anomalías cromosómicas o incremento de fragmentación del ácido desoxirribonucleico o DNA (Kasimanickam et al., 2007), teniendo un efecto negativo en los resultados de ART (Benchaib et al., 2003; Morris et al., 2002).

Benchaib et al. (2003), Borini et al. (2006), Gualtieri et al. (2014), Larson et al. (2000) Morris et al. (2002) y Walters et al. (2005), han enfocado sus estudios en probar la posible correlación entre las alteraciones del genoma paterno sobre la fecundación, división y desarrollo embrionario y las tasas de aborto, tanto en fecundación in vitro (FIV) como en la inyección intra-citoplasmática del espermatozoide (ICSI). Los hallazgos de estos estudios sugieren que las alteraciones en el genoma paterno pueden comprometer no solamente la fecundación y calidad embrionaria, sino también la viabilidad del embrión y el progreso de la gestación, provocando abortos espontáneos.

Hasta la fecha, estudios en el hombre (De Jonge, 2000; De Jonge, 2005) y animales (bovino, Ward, et al., 2001; Ward, et al., 2003; cerdo, França, 2005; aves, Lodge et al., 1971) han realizado la importancia del efecto macho, teniendo su origen y pertinencia en la edad (Paulson et al., 2001), variabilidad entre machos (Ward et al., 2001; Ward, et al., 2003; Chenoweth, 2007), exposición ambiental (Rockett et al., 2001; Haugan et al., 2005; Hernández-Ocho et al., 2005) e incluso agentes infecciosos (Wrathall et al., 2006), lo que estimula el perfeccionamiento y mejoramiento de los métodos de selección y evaluación de espermatozoides frescos o congelados (Cesari et al., 2006; Córdova-Izquierdo et al., 2006).

En general, cualquier alteración en la espermatogénesis que dé lugar a una elevada incidencia de espermatozoides anormales, tiene el potencial de afectar negativamente a un mayor porcentaje de la población de espermatozoides, que los detectados con los medios o técnicas

convencionales. En estas poblaciones, los espermatozoides que parecen ser morfológicamente normales, pudieran estar comprometidos en términos de su capacidad para lograr la fecundación o mantener la preñez (Smorag et al., 2000).

Por lo tanto, en los toros, las diferencias en el éxito reproductivo a menudo no se explican a través de la evaluación convencional del semen. Por lo que, aportes adicionales pueden derivarse haciendo uso de técnicas de FIV. La presente revisión pretende ofrecer una idea de cuáles son los factores que limitan la supervivencia y desarrollo normal del embrión mamífero, y resaltar cuáles son las más recientes líneas de trabajo para estudiar el aporte del gameto masculino en el campo de la embrionaria moderna.

VARIABILIDAD ENTRE MACHOS

Saacke et al. (2000), afirman que la diferencia observada entre toros se refleja en el desarrollo y supervivencia del embrión valorados tanto en los sistemas de producción in vivo como in vitro. Por su parte, Ward et al. (2001), concluyen que el toro usado en FIV puede tener un efecto marcado sobre la proporción de ovocitos desarrollados hasta el estadio de blastocistos, y este efecto está relacionado con el tiempo en el que ocurre la primera división después de la fecundación para un mismo toro, e incluso la cinética de desarrollo de los primeros estadios embrionarios puede ser usada para discriminar entre toros de alta o baja fertilidad.

Más tarde Barros et al. (2006), evaluaron sesenta y tres muestras de semen de toros para la PIV y TE, donde el porcentaje de división embrionaria estuvo entre un 36,3–93,4%, sin mostrar diferencias significativas entre toros; mientras que el porcentaje de blastocistos hasta el día 7 se mantuvo entre 6,9-51,2% encontrando variación entre toros. Estos resultados indican que existen diferencias entre toros que pueden interferir en la supervivencia y desarrollo embrionario en los sistemas in vitro y que existen efectos tanto del macho como de la hembra relacionados con la eficiencia de los programas de PIV.

El trabajo de Bulman de 1979 (citado por Chenoweth, 2007) indicó que los toros usados para la IA difirieron en las tasas de mortalidad embrionaria, y que ocurrieron mayores pérdidas embrionarias con los toros de baja fertilidad comparado con los toros de la alta fertilidad. La individualidad de los mismos también difiere en su contribución al desarrollo embrionario, a pesar de tener tasas similares de fecundación y división embrionaria después de FIV. En un estudio que involucraba dos razas de ovejas se mostraron diferencias en las tasas de pérdida embrionaria, a pesar de la semejanza de la capacidad de fecundación (Maxwell et al., 1992).

Las tasas de división embrionaria evaluadas en tres grupos de toros (73, 70 y el 65%) no resultaron diferentes; mientras que la supervivencia hasta el estadio de mórula o estadios más avanzados favorecía al grupo de toros de más alta fertilidad (Schneider et al., 1999). En toros, las diferencias en el éxito reproductivo no son explicadas a menudo por las pruebas convencionales de evaluación de semen. Las diferencias adicionales entre machos pueden ser evidenciadas usando técnicas como los sistemas PIV y los programas de transferencia de embriones producidos in vivo.

Así, lo demostró Morris et al. (2003), encontrando diferencias entre cuatro razas de moruecos con respecto al tiempo necesario para el desarrollo embrionario, en relación con los resultados morfológicos y de la integridad del acrosoma espermático. Khalifa et al. (2008), manifiesta que los toros Blonde d'Aquitaine presentan una mayor resistencia a la descondensación de la cromatina nuclear que el grupo de toros Limousine en semen fresco; mientras que este último presentó una menor susceptibilidad a la desnaturalización del DNA, comparado con el primer grupo, en semen congelado. Salisbury et al. (1977; citado por Chenoweth, 2005) afirma que existen diferencias en el DNA espermático, no solamente entre individuos de la misma especie sino entre espermatozoides del mismo eyaculado.

Adicionalmente, los embriones provenientes de ovocitos de vacas Holstein (*B. taurus*) fecundados con semen de Nerole (*B. indicus*) fueron más resistentes al estrés calórico al compararlos con el cruce de Angus (*B. taurus*), sugiriendo que la raza del macho influye sobre la tolerancia del embrión. Estos resultados apoyan la idea de lograr un aumento en la tasa de preñez en vacas sometidas a estrés calórico al ser inseminadas con toros cebú (Barros et al., 2006).

El desarrollo de un método exacto y práctico, para predecir la fertilidad del macho ha sido un reto de muchos años en la práctica de la IA en bovinos. Las pruebas convencionales que incluyen la concentración, movilidad y morfología del espermatozoide no son del todo certeras para predecir la fertilidad de un espécimen, y aún menos al conocer que existen diferencias en calidad entre eyaculados del mismo toro. Por lo tanto, las pruebas actuales para la evaluación del semen deben contemplar la viabilidad (morfología, concentración, movilidad progresiva), supervivencia (después de la incubación por 2 horas), una estimación in vitro de la calidad espermática en el sitio de fecundación (Phillips et

al., 2004), madurez (Chenoweth, 2005) e integridad de la cromatina (Khalifa et al., 2008), capacidad de la fecundación in vitro, y la tasa de división y desarrollo embrionario (Phillips et al., 2004).

Tabla 1. Defectos mayores y menores en el espermatozoide de toro (Modificada de Chenoweth, 2005)

Mayores	Menores
Desarrollo incompleto	Cabeza estrechas
Formas Dobles	Cabezas pequeñas
Defectos en el acrosoma	Puntas de cabeza gigantes y
Espermatozoides decapitados (colas)	Cabezas normales libres
Defecto diadema	Membranas acrosomales
Defecto en forma de pera	Implantación abaxial
Estrechos en la base	Cola ligeramente doblada
Contorno anormal	Gotas distales
Cabeza pequeña	Punta de la cola en espiral
Cabezas libres	Presencia de células
Defecto sacacorcho	epiteliales, eritrocitos,
Otros defectos de la pieza intermedia	células redondeadas, etc.
Cráteres	

MORFOLOGIA DEL ESPERMATOZOIDE Y DAÑO OXIDATIVO

Los espermatozoides anormales pueden reducir la fertilidad de tres maneras: (1) por ser incapaces de alcanzar el sitio de la fecundación o (2) por no fecundar el ovocito una vez que hayan alcanzado el sitio de fecundación o (3) no sostener el desarrollo temprano del embrión. En el primer caso, la incapacidad del espermatozoide de alcanzar el sitio de la fecundación se puede relacionar a menudo con los defectos morfológicos o de movilidad y son denominados defectos compensables (Saacke et al., 2000); mientras que aquellos defectos que conducen a una falla en la fecundación o a la pérdida temprana de la preñez se denominan incompensables (Saacke et al., 2000). En presencia de estos defectos, un aumento en el número de espermatozoides solamente, no mejorará teóricamente la fertilidad (Chenoweth, 2005). En la tabla 1 se muestran los defectos más comunes en el espermatozoide de toro.

Uno de los componentes esenciales de los espermatozoides necesario para la formación normal del embrión es un material nuclear intacto. Un alto nivel de inestabilidad de la cromatina espermática se asocia con una reducida eficiencia reproductiva en los toros, que conlleva a fallas en la fecundación y mortalidad embrionaria (Anzar et al., 2002; Walters et al., 2004). Esta característica está altamente relacionada con la presencia de vacuolas nucleares (Walters et al., 2004). El porcentaje de espermatozoides con una o más vacuolas en semen fresco y congelado es indicio también de una condensación nuclear incompleta (revisado por Khalifa et al., 2008).

Varios mecanismos pueden dañar o causar alteraciones en el DNA del espermatozoide; entre estas las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la apoptosis (Agarwal y Allamaneni, 2004). Los altos niveles de ROS pueden desempeñar un papel dominante en la infertilidad masculina. Las ROS incluyen moléculas radicales libres de oxígeno, tales como: anión superóxido (O_2^-), radical perhidroxilo (HO_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y entidades biológicas importantes no radicales que incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso (HClO) (Bennetts & Aitken, 2005). En un estudio publicado en 2016, Gürlér et al., concluyen que los cambios en la integridad del DNA en los espermatozoides congelados de bovino parecen estar relacionados con la síntesis de H_2O_2 , pero no con la viabilidad de los espermatozoides ni a la síntesis de otras ROS. Las ROS están implicadas en la mayoría de las funciones normales del espermatozoide incluyendo la activación de la motilidad, capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica. Sin embargo, los daños ocurren, particularmente en la membrana plasmática, y el DNA. Al parecer el DNA mitocondrial del espermatozoide es más susceptible al ataque oxidativo que el DNA nuclear (Bennetts & Aitken, 2005). Los factores que se asociaron a la tensión oxidativa en el gameto masculino incluyen las altas temperaturas, tabaquismo, metales pesados, radiación ionizante, deficiencia de zinc, envejecimiento, criopreservación. Muchos estudios han reportado que las ROS son la mayor causa de daño al DNA espermático (Agarwal y Allamaneni, 2004).

Más recientemente, Gualtieri et al. (2014), demostraron que la suplementación de los medios de dilución para espermatozoides con zinc, la coenzima Q10 (antioxidantes) y el micronutriente D-Aspartato (D-Asp), mejoran la competencia de desarrollo de los embriones producidos in vitro, con un aumento significativo del porcentaje de embriones mayores de 8 células y de blastocistos. Estos hallazgos enfatizan la necesidad obligatoria de evitar el estrés oxidativo asociado a la criopreservación de espermatozoides y la manipulación en la reproducción asistida.

ANOMALIAS CROMOSOMICAS

La evaluación de las anomalías cromosómicas en el macho ha cobrado gran interés recientemente, dado los avances de las técnicas de reproducción asistida y biología molecular (Zidi-Jrah et al., 2016). Lo que sugiere que las tasas de mutación son más altas en machos que en hembras. Una explicación a este hecho podrían ser las numerosas divisiones celulares que ocurren durante la espermatogénesis, aumentando la probabilidad de que la mutación sea exhibida en el espermatozoide. Existen en esencia dos clases de anomalías cromosómicas: estructurales (deleciones en el cromosoma Y, translocaciones) y numéricas (aneuploidías, trisomías), que pueden desempeñar un papel en la infertilidad del macho (De Jonge, 2000).

Existe un efecto macho en las anomalías cromosómicas numéricas del cigoto y aunque difícil de cuantificar, es innegable (revisado por Chenoweth, 2005). En los seres humanos, la trisomía 21 se ha demostrado que en un 20% tiene origen paterno, y un 40% para el síndrome de Klinefelter (revisado por Pujol et al., 2003). Las anomalías numéricas del cromosoma tales como trisomías y triploidías tienen un origen paterno que contribuyen con la mortalidad embrionaria temprana en animales domésticos. En hombres estériles con semen de baja calidad, se ha sugerido una relación directa entre el daño a nivel de la espermatogénesis (según lo reflejado en las características morfológicas y citogenéticas en células sexuales anormales) y los índices de aneuploidía en los espermatozoides normales. De donde se concluye que la mayoría de las aneuploidías espermáticas son responsables de las bajas tasas de fertilidad, así como de la reducida supervivencia del embrión (Chenoweth, 2007).

Por otro lado, se tiene que las anomalías estructurales se relacionan con un 3 a 6% de abortos espontáneos en los seres humanos. Estas implican roturas y translocaciones que son esencialmente de origen paterno, al igual que el aproximadamente 35% de translocaciones Robertsonianas (Pujol et al., 2003). Las deleciones en el cromosoma Y, en humanos, se asocian a infertilidad, especialmente cuando la azoospermia está implicada. Tales deleciones ocurren en un nivel relativamente alto, indicando que el cromosoma Y es susceptible a la pérdida de material genético, no solamente debido a las fallas genéticas sino también a la exposición a ciertos agentes ambientales (Chenoweth, 2007). En varios modelos animales se ha demostrado que los cariotipos anormales son substancialmente más altos en los ovocitos sometidos a ICSI con espermatozoides con severas malformaciones en la cabeza (revisado por Chenoweth, 2007). Esto coincide con lo reportado por Bonduelle et al. (1996; citado por De Jonge, 2000), donde niños nacidos, concebidos usando ICSI, mostraron aneuploidías en cromosomas sexuales (XXY), en los que se emplearon eyaculados con azoospermia y oligoastenoteratozoospermia.

MADURACIÓN ESPERMÁTICA

La espermatogénesis en mamíferos es un proceso único y complejo que involucra cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos en los que las espermatogonias, pasan de ser células diploides a haploides, con núcleo condensado, flagelo y acrosoma. La espermatogénesis está caracterizada por tres estadios: (1) espermatocitogénesis, (2) meiosis de espermatocitos; y (3) espermiogénesis (Johnson et al., 2000). La primera consiste en divisiones mitóticas que involucra el mantenimiento y proliferación de las espermatogonias (França, et al., 2005; D' Occhio et al., 2007). La meiosis comprende el intercambio del material genético en los espermatocitos primarios y la producción de los espermatides haploides (Johnson et al., 2000); mientras que la espermiogénesis está caracterizada por tres eventos críticos: (1) el desarrollo del acrosoma, (2) la organización de una cola que contiene una axonema dinámico encerrado en un andamio de queratina y (3) la elongación y compactación del núcleo en conjunto con la organización microtubular (Kierszenbaum, 2001).

Este importante cambio de la cromatina, está protagonizado por la sustitución de las histonas por las protaminas, en el que ocurre la acetilación de las histonas, un incremento en la actividad de ubiquitinación, cese de la transcripción y un cambio en la topología del DNA. Este proceso tiene como resultado un empaquetamiento del DNA alrededor de seis veces mayor que el de las células somáticas (revisado por Boissonneault, 2002). La compactación es necesaria para proteger la cromatina espermática durante el tránsito a través del epidídimo y el tracto reproductivo de la hembra (D' Occhio et al., 2007). Existen evidencias que muestran que la sustitución de histonas por protaminas no se da por completo. Aunque la retención de una porción de las histonas (<15% en espermatozoides humanos), se cree que es vital para la activación de genes

antes y después de la fecundación, una proporción excesiva de histonas indica inmadurez de la cromatina espermática y en ocasiones fallos en las funciones espermáticas. Modificaciones post-transcripcionales como la metilación, acetilación, y fosforilación de las histonas pueden influenciar epigenéticamente la accesibilidad del genoma del macho a los factores de transcripción maternos durante el desarrollo embrionario. (revisado por De Oliveira et al., 2013).

Anomalías en la estructura de la cromatina espermática podrían ser producto de una maduración anormal de las espermátidas debido a alteraciones de las protaminas, fallo de la apoptosis o estrés oxidativo (Kasimanickam et al., 2007). En ratones y humanos el evento de sustitución proteica puede originar ruptura de una o ambas hebras del DNA, que, si no son reparadas de manera oportuna, pueden conllevar a la fragmentación del DNA de espermatozoides eyaculados (Kasimanickam et al., 2007). La acción de las protaminas sobre el DNA se centra en la posibilidad de crear un acoplamiento mucho más estrecho por la unión a través de puentes disulfuro, determinantes de la estabilidad de la cromatina y consecuentemente la reducción de estos puentes disulfuro puede alterar la estructura e integridad nuclear (Hammadeh et al., 2001; Januskauskas & Zilinskas, 2002).

El proceso de descondensación ocurre durante la fecundación, es lógico pensar que la poca estabilidad de la cromatina provoque la descondensación prematura de la misma, estableciéndose de esta manera fallas en la formación de los pronúcleos y el desarrollo embrionario (Hammadeh et al., 2001). Por esta razón, la integridad de la cromatina espermática es vista como un factor importante en la fertilidad del macho y en la contribución particular del espermatozoide en el desarrollo temprano del embrión (D' Occhio et al., 2007; García-Macias et al., 2006).

ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

Existen nuevas evidencias que afirman que la integridad de la cromatina espermática, es importante no solamente para la fecundación sino también para el desarrollo normal del embrión (Ward et al., 2000; Morris et al., 2002). Espermatozoides eyaculados con integridad del DNA comprometida, a pesar del grado de daño sobre el DNA, poseen la capacidad de fecundar ovocitos con la misma tasa que los espermatozoides normales (revisado por D' Occhio et al., 2007). Sin embargo, la intensidad del daño sobre el DNA está relacionada con el desarrollo embrionario. A pesar de la posibilidad de que el ovocito tenga la capacidad de reparar cierto daño preexistente en el DNA espermático, aun así, la tarea de reparación del ovocito parece insuficiente o inadecuada y hay una falla en la progresión del desarrollo embrionario. Los cambios en la estructura, altamente definida, de la cromatina del espermatozoide se cree pueden influenciar la iniciación y regulación de la expresión de genes paternos en los primeros estadios del desarrollo embrionario (revisado por D' Occhio et al., 2007).

Daños en la cromatina espermática en ratones (Zhao et al., 2001), humanos (Benchaib et al., 2003) y bovinos (Ward et al., 2000) fueron asociados con la descondensación anormal de la cromatina y a un intervalo de tiempo más largo en la iniciación de la formación de los pronúcleos, después de la fecundación. Una modificación relativamente sutil de las proteínas nucleares del espermatozoide puede ser responsable de la falla en la formación del cigoto, lo que lo relaciona directamente con el desarrollo del embrión (Ward et al., 2000).

La incorporación de la técnica de la ICSI a los programas de reproducción asistida ha facilitado el uso exitoso de semen proveniente de varones con oligozoospermia severa, teratozoospermia, azoospermia o con espermatozoides inmóviles (Engel et al., 1996; citado por Verberckmoes et al., 2002). Sin embargo, algunos estudios han divulgado que esta pobre calidad espermática, conducen a porcentaje muy bajo de embriones que llegan hasta blastocistos y de blastocistos de baja calidad e índices muy bajos de gestaciones (D' Occhio et al., 2007). Larson et al. (2000), observaron en pacientes que presentaron un índice de fragmentación del DNA (IFD) mayor al 27% no lograron embarazos después de FIV o de ICSI (valorados a través del análisis de la estructura de la cromatina espermática, SCSA). Estos mismos autores también observaron que los pacientes con espermatozoides con morfología anormal podrían lograr un embarazo después de ICSI si la misma muestra presentaba un IFD entre 0-15%. Esto permite sugerir que el SCSA proporciona una medida de la fertilidad masculina que es diferente a las medidas convencionales de calidad del semen (Januskauskas & Zilinskas, 2002).

DESARROLLO EMBRIONARIO

Yadav et al. (1993) y Hartshorne (2000), afirman que, tanto en bovinos como en humanos, el momento de la primera división celular del cigoto es un parámetro valioso de la calidad intrínseca del embrión. Lechniak et al., (2008) y Sugimura et al. (2012), sostienen que los cigotos que se

dividen más temprano son más propensos a alcanzar mayores tasas de división y mayor número de blastómeras (>4 células), e incluso llegar a blastocistos que aquellos cigotos con división tardía.

Sirard et al. (2006), completan la idea anterior, aportando que la capacidad de división celular es la prueba más evidente del potencial y de la calidad de ambos gametos y del embrión en formación. Cuando la división no llega a ocurrir, puede ser consecuencia de la disfunción por parte del espermatozoide que falla en su función de activación del ovocito o que este no posee la habilidad o la competencia para llevar con éxito la primera división celular. La evaluación de cientos de ovocitos que no muestran división después a las 36 h post-inseminación indica que la mayoría no fueron fecundados y sólo una pequeña proporción mostró una descondensación incompleta del espermatozoide o pronúcleos asincrónicos.

El momento de la primera división junto con la proporción de cigotos que comienzan a dividirse se asocia con varios parámetros que pueden afectar el potencial de desarrollo de los embriones resultantes (Van Soom et al., 2003). El mecanismo que causa la variación de estos fenómenos no ha sido identificado, pero puede estar relacionado con la regulación genética, calidad de los gametos, o bien, con los factores ambientales y condiciones de cultivo in vitro (Lechniak et al., 2008).

El primer efecto paterno sobre el desarrollo del embrión se ha observado en el inicio de la fase de síntesis (fase-S) durante la primera división mitótica (Urner & Sacas 1999). Por lo que el componente paterno podría regular la disponibilidad de los factores maternos como la proteína P1 o el factor de inicio de replicación, que son imprescindibles para el inicio de esta fase. Un estudio con cigotos de ratón demostró que la penetración del espermatozoide conduce a la producción de ribosa 5-fosfato por la vía pentosa fosfato (Uner & Sacas 1999). También podría afectar el patrón de la acetilación de las histonas, que está implicado en la accesibilidad al DNA antes de la fase-S. El primer ciclo de división celular en embriones mamíferos está caracterizado por una duración de casi 24 horas, periodo en el cual el genoma paterno permanecen separado dentro del mismo ambiente citoplasmático. En el ratón, la duración de la primera síntesis del DNA se correlaciona positivamente con el desarrollo exitoso del embrión y depende del genotipo paterno; mientras que el tiempo de inicio después de la fecundación no varía en relación al macho (Comizzoli et al., 2000).

Comizzoli et al. (2000), demostraron que el tiempo de inicio y finalización de la primera síntesis de DNA en embriones bovinos desempeña un papel importante en el potencial de desarrollo del embrión y que esta característica es esencialmente dependiente del componente paterno. Al usar toros de alta fertilidad se reduce el tiempo de inicio de síntesis lo que conduce a una mayor proporción de blastocistos (Figura 1). En el estudio realizado por Tanghe et al. 2004 (citado por Vandaele et al., 2006) se concluye que el número de blastómeras con fragmentación del DNA es mucho menor en embriones que iniciaron más rápidamente las divisiones celulares. Anteriormente se pensaba que la aparición de apoptosis estaba estrechamente relacionada con la alta o baja fertilidad del macho, los resultados obtenidos por Vandaele et al. (2006) no arrojan evidencias suficientes para afirmar esta relación.

A pesar de que el éxito del desarrollo embrionario depende de los factores genéticos tanto de la hembra como del macho, el efecto del macho sobre el desarrollo embrionario no es del todo entendido y frecuentemente subestimado (Vandaele et al., 2006). Recientemente, Braga et al. (2015), estudiando la influencia negativa de los espermatozoides bovinos criopreservados sobre la calidad y desarrollo embrionario concluyen que la calidad del embrión en los primeros estadios de división, así como la posibilidad de la formación de blastocisto, no fue influenciada por el origen de los espermatozoides cuando la calidad de los ovocitos no se consideró. En ovocitos con dimorfismos extracitoplasmáticos, la inyección de espermatozoides crioconservados, no afectó a la calidad del embrión durante la etapa de división, pero si se evidenció un efecto en la formación de blastocistos. Por el contrario, en los ovocitos con defectos intracitoplasmáticos, la calidad de los embriones en los primeros estadios de división y en la formación de blastocistos fueron influenciados negativamente por la inyección de espermatozoides crioconservados.

EFFECTOS AMBIENTALES E INFECCIOSOS

Se sabe que la exposición de los testículos a una temperatura elevada conlleva a la interrupción de la espermatogénesis y a la infertilidad. Numerosos estudios han demostrado este efecto de hipertermia en los testículos de muchas especies como: roedores, bovinos, porcino, ovinos y humanos. Por ejemplo, en roedores, el choque térmico, provoca descenso del número y calidad espermática, bajas tasas de fecundación y un prolongado retardo en el crecimiento del embrión (Rockett et al., 2001). Consecuencias similares se presentan al someter al animal a climas templados. Consecuencias similares se presentan al someter a toros a insolación escrotal, provocando pérdida de la estabilidad del DNA y

conformaciones anormales en el espermatozoide (Karabinus et al., 1997). Los procesos de criopreservación también están ligados a estos daños (Brito et al., 2003).

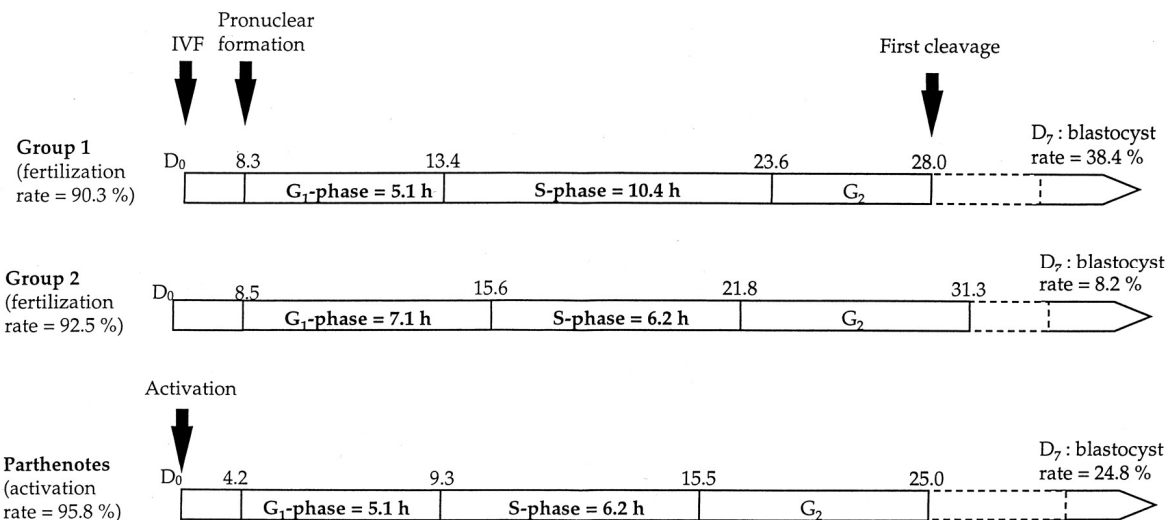


Figura 1. Tiempo transcurrido del curso de la réplica de la DNA dentro del primer ciclo de división celular en embriones bovinos PIV. Toros de alta fertilidad (grupo 1). Toros de baja fertilidad (grupo 2). Ovocitos partenogénéticos (grupo 3). (Tomada de Comizzoli et al., 2000).

La exposición ocupacional a los metales pesados (niveles de plomo, Pb, en sangre $>40\mu\text{g/dL}$) ha sido asociada con la reducción de la calidad del semen, abortos espontáneos y efectos directos sobre las funciones testiculares en humanos. El Pb, en particular, ha sido involucrado directamente como causal de alteraciones en la cromatina espermática (Hernández-Ochoa et al., 2005), ya que el Pb tiene alta afinidad por las proteínas ricas en grupos sulfhidrilos y se une a los grupos tioles de las protaminas del espermatozoide, sugiriendo que esta interacción puede comprometer la condensación de la cromatina. Este efecto es debido a la formación de puentes $-S-Pb-S-$ o la interacción con los residuos de arginina y cisteína, por lo que la interacción que en principio formaban las protaminas se hace más laxa, relacionándolo con el decremento de la condensación de la cromatina (Hernández-Ochoa et al., 2006). Los datos de estos autores, sugieren que el efecto del Pb sobre la cromatina espermática depende del tiempo de su incorporación durante la espermatogénesis, ya que el grupo de espermatozoides que después de la maduración epididimaria fueron expuestos al metal, presentaron un efecto contrario, una mayor condensación de la cromatina (Hernández-Ochoa et al., 2006).

Por su parte, Contri et al. (2013), afirman que los resultados de movilidad comprometida y bajas tasas de fecundación se deben a la calidad microbiológica del semen utilizado para la FIV. Las infecciones bacterianas conducen a un incremento del pH del plasma seminal y con ello una reducción significativa de la movilidad a consecuencia de la disminución de la actividad mitocondrial. Estos mismos autores observaron que el ajuste del pH en los medios de dilución seminal entre 7 y 7,5, permitió obtener los valores más altos de viabilidad, actividad mitocondrial, movilidad total y progresiva en el semen de toro, concluyendo que el pH de los medios podría ser considerado en todos los estudios en el que la evaluación de la movilidad es usada de manera rutinaria.

Aunque el semen es un vector importante para las enfermedades virales, las pruebas para los virus en semen no han sido del todo extendidas. La interacción virus-esperma puede tener un gran número de consecuencias adversas. Los virus se han encontrado en ambos compartimientos testiculares y pueden ser protegidos por la barrera hematotesticular de los mecanismos y tratamientos de defensa propio del organismo, permitiendo que el testículo se convierta en un depósito viral (Chenoweth, 2007). El interés en las infecciones virales se centra sobre todo en los efectos de estas sobre fecundación y el desarrollo embrionario. El virus de VIH, en seres humanos, además de adherirse a los espermatozoides atraviesa la membrana plasmática e incluso puede llevar a replicarse, aunque este último hecho no está del todo claro (Chenoweth, 2007).

El polimavirus, el papovavirus (SV40), el virus del papiloma humano (VPH) y el virus de la hepatitis B (HBV) se caracterizan no solo por estar presentes en la célula espermática sino además de ser encontrados en el ovocito, cigoto e incluso persistir en blastocistos. El HBV, posee la potencialidad de integrarse en el pronúcleo, núcleo y cromosomas de embriones de primeros estadios y así poder pasar de una generación a otra (revisado por Wrathall et al., 2006). Las bacterias también se pueden integrar a esta lista: *Ureaplasmas urealyticum*, causa inestabilidad de la cromatina, sin aparente daño a la motilidad espermática (D'Occhio et al., 2007) y *Micoplasma bovis*, puede causar daños en la morfología del espermatozoide y también estar involucrada con problemas de post-fecundación y con el desarrollo e implantación del embrión (Wrathall et al., 2006).

CONCLUSIONES

Las biotecnologías reproductivas tales como IA, ICSI, producción in vivo e in vitro de embriones pueden ser usadas para explotar el genotipo del espermatozoide y del ovocito y para producir animales mestizos que sean tolerantes a las condiciones ambientales. Pero antes, se debe conocer el origen que conduce a la baja tasa de gestación. Con la FIV se puede detectar tempranamente anomalías o fallas por parte del macho donador, o bien, de la calidad espermática en particular; esto mediante la valoración de la tasa de división, producción y calidad de los blastocistos. Por lo que, la FIV y el desarrollo de nuevas pruebas para la calidad espermática, pueden ser usadas como herramienta para estudiar la influencia del macho después de la fecundación y el posterior desarrollo embrionario, y tal vez, ofrecer medidas correctivas, preventivas o predictivas.

REFERENCIAS

- Agarwal A., Allamaneni S. 2004. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. **Minerva Ginecologica** 56:235-245.
- Anifandis G., Dafopoulos K., Messini C., Polyzos N., Messinis I. 2013. The BMI of men and not sperm parameters impact on embryo quality and the IVF outcome. **Andrology** 1:85-89.
- Anzar M., He L., Buhr M., Kroetsch T., Pauls K. 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction** 66:354-360.
- Aston K., Uren P., Jenkins T., Horsager A., Cairns B., Smith A. Carrel D. 2015. Aberrant sperm DNA methylation predicts male fertility status and embryo quality. **Fertility and Sterility** 104:1388-97.
- Barros C., Pegorer M., Vasconcelos J., Eberhardt B., Monteiro F. 2006. Importance of sperm genotype (*indicus versustaurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. **Theriogenology** 65:210-218.
- Benchainb M., Braun V., Lornage J., Hadj S., Salle B., Lejeune H., Guerin J. 2003. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction** 18:1023-1028.
- Bennetts L., Aitken R. 2005. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**. 71:77-87.
- Boissonneault G. 2002. Chromatin remodeling during spermatogenesis: a possible role of the transition protein in DNA strand break repair. **FEBS Letters** 514:111-114.
- Borini A., Tarozzi N., Bizarro D., Bonu M., Fava L., Flamigni C., Coticchio G. 2006. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. **Human Reproduction** 21:2876-2881.
- Braga D., Setti A., Figueira R., Iaconelli A., Borges, E. 2015. The negative influence of sperm cryopreservation on the quality and development of the embryo depends on the morphology of the oocyte. **Andrology** 3:723 [Abstract].
- Brito L., Barth A., Bilodeau-Goeseels S., Panich P., Kastelie J. 2003. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology** 66:1185-1193.
- Cesari A., Kaiser G., Mutto A., Vicenti A., Fornes M., Alberio R. 2006. Integrated morphophysiological assement of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology** 66:1185-1193.
- Chenoweth P. 2005. Genetic sperm defect. **Theriogenology** 64:457-468.
- Chenoweth P. 2007. Influence of male on embryo quality. **Theriogenology** 68:308-315.
- Comizzoli P., Marquant-Le B., Heyman Y., Renard J. 2000. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. **Biology of Reproduction** 62:1677-1684.
- Contri A., Gloria A., Robbe D., Valorz C., Wegher L., Carluccio A. 2013. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. **Anima Reproduction Science** 136:252-259.
- Córdova-Izquierdo A., Oliva J., Lleó B., García-Artiga C., Corcuera B., Pérez-Gutiérrez J. 2006. Effect of different thawing temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 ml straws. **Animal Reproduction Science** 92:145-154.
- D'Occhio M., Hengstberger K., Johnston S. 2007. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science** 101:1-17.

- De Jonge C. 2000. Paternal contributions to embryogenesis. **Reproduction Medical Review** 8:207-214.
- De Jonge C. 2005. Biological basis for human capacitation. **Human Reproduction Update** 11:205-214.
- França L., Avelar G., Almeida F. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epidymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology** 65:300-318.
- Gadella B., Boerke A. 2016. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization. **Theriogenology** 85:113-124.
- García-Macías V., Martínez-Pastor F., Álvarez M., Garde J., Anel E., Anel L., De Paz P. 2006. Assessment of chromatin status (SCSA®) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. **Theriogenology** 66:1921-1930.
- Gualtieri R., Barbato V., Fiorentino I., Braun S., Rizo D., Longobardi S., Talevi R. 2014. Treatment with zinc, D-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. **Theriogenology** 82:592-582.
- Gürler H., Malama E., Heppelmann M., Calisci O., Leiding C., Kastelic J., Bollwein H. 2016. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species and DNA damage of bovine sperm. **Theriogenology** doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.02.007.
- Hammadeh M., Strehler E., Zeginiadou T., Rosenbaum P., Schmidt W. 2001. Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after ICSI. **Archives of Andrology** 47, 83-87.
- Hartshorne G. 2000. Embryo. **Human Reproduction** 15:31-41.
- Haugan T., Reksen O., Gröhn Y., Kommisrud E., Ropstad E., Sehested E. 2005. Seasonal effects of semen collection and artificial insemination on dairy cow conception. **Animal Reproduction Science** 90:57-71.
- Hernández-Ocha L., Sánchez-Gutiérrez M., Solís-Heredia M., Quintanilla-Vega B. 2006. Spermatozoa nucleus takes up lead the epididymal maturation altering chromatin condensation. **Reproductive Toxicology** 21:171-178.
- Hernández-Ochoa L., García-Vargas G., López-Carrillo L., Rubio-Andrade M., Moran-Martínez J., Cerbrían M., Quintanilla-Vega B. 2005. Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. **Reproductive Toxicology** 20:221-228.
- Januskauskas A., Zilinskas H., 2002. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. **Veterinarija ir zootechnika** 17 (39).
- Johnson L., Varner D., Roberts M., Smith T., Keillor G., Scrutchfield W. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science** 60–61:471–480.
- Karabinus D., Vogler Ch., Saacke R., Evenson D. 1997. Chromatin Structural Changes in Sperm After Scrotal Insulation of Holstein Bulls. **Journal of Andrology** 18: 549-555.
- Kasimanickam R., Nebel R., Peeler I., Silvia W., Wolf K., McAllister A., Cassell B. 2007. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. **Theriogenology** 66: 1307-1315.
- Kato Y., Shoei S., Nagao Y. 2011. Capacitation status of activated bovine sperm cultured in media containing methyl- β -cyclodextrin affects the acrosome reaction and fertility. **Zygote** 19:21- 30.
- Khalifa T., Rekkas C., Lymberopoulos A., Sioga A., Dimitriadis I., Papanikolaou T. 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science** 104 (2-4):143-63.
- Kierszenbaum A. 2001. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. **Molecular Reproduction and Development** 58:357-358.
- Larson K., De Jonge C., Barnes A., Jost L., Evenson D., 2000. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Human Reproduction** 15:1717-1722.
- Lechniak D., Pers-Kamczyc E., Pawlak P. 2008. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. **Reproductive Biology** 1:23-42.
- Lee H., Kim S., Ji D., Kim Y. 2009. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and FIV results for cryopreserved bovine semen. **Journal Veterinary Science** 10:249-255.
- Lodge J., Fehcheimer N., Jaap R. 1971. The relationship of in vivo sperm storage interval to fertility and embryonic survival in the chicken. **Biology of Reproduction** 5:252-257.
- Loneragan P., Fair, T. 2008. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology** 69:17-22.
- Loneragan P., Rizo D., Gutiérrez-Adán A., Fair, T., Boland, M. 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals** 38:259-267.
- Maxwell W., Quintana-Casares P., Setchell B. 1992. Ovulation rate, fertility, and embryo mortality in ewes mated to rams from two different strains. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production** 19:192-194.
- Meirelles F.V., Caetano A.R., Watanabe Y.F., Ripamonte P., Carambula S.F., Merighe G.K., Garcia S.M. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science** 82-83:13-20.
- Morris I., Hott S., Dixon L., Brison D. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction** 17:990-998.
- Morris L., Randall A., King W., Johnson W., Buckell B. 2003. The contribution of male to ovine embryogenesis in an in vitro embryo production system. **Animal Reproduction Science** 75:9-26.
- Nakai M., Ito J., Kashiwazaki N., Men N., Tanihara F., Noguchi J., Kaneko H., Onishi A., Kikuchi K. 2016. Treatment with protein kinase C activator is effective for improvement of male pronucleus formation and further embryonic development of sperm-injected oocytes in pigs. **Theriogenology** 85:703-708.
- Ohgoda O., Niwa K., Yuhara M., Takahashi S., Kanoya K. 1988. Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. **Theriogenology** 29:1375-1381.
- Parrish J. 2014. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology** 81:67-73.

- Paulson R., Milligan R., Sokol R. 2001. The lack of influence of age on male fertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** 5:819-824.
- Phillips N., McGowan M., Johnston S., Mayer D. 2004. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science** 81:47-61.
- Pujol A., Durban M., Benet J., Boiso I., Calafell J., Egozcue J., Navarro J. 2003. Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. **Reproduction** 126:701-711.
- Rockett J., Mapp F., Garges B., Luff C., Mori C., Dix D. 2001. Effect of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. **Biology of Reproduction** 65:229-239.
- Rodríguez-Villamil P., Hoyos-Marulanda V., Martins J., Oliveira A., Aguiar L., Moreno F., Velho A., Monteiro-Moreira A., Moreira R., Vasconcelos I., Bertolini M., Moura A. 2016. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology** 85:540-554.
- Saacke R., Dalton J., Nadir S., Nebel R., Bame J. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science** 60-61:663-677.
- Schneider C., Ellington J., Wright R. 1999. Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. **Theriogenology** 51:1085-1098.
- Sirard M., Richard F., Blondin P., Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology** 65:126-136.
- Smorag Z., Bochenek M., Wojdan Z., Sloniewski K., Reklewski Z. 2000. The effect of sperm chromatin structure on quality of embryos derived from superovulated heifers. **Theriogenology** 53:201 [abstract].
- Spanó M; Bonde J., Hjøllund H; Kolstad H., Cordelli E; Leter G. 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. **Fertility and Sterility**. 73:43-50. [Abstract].
- Sugimura S., Akai T., Hashiyada Y., Somfai T., Inaba Y., Hirayama M., Yamanouchi T., Matsuda H., Kobayashi S., Aikawa Y., Ohtake M., Kobayashi E., Konishi K., Imai K. 2012. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. **PLoS ONE** 7:e36627. doi:10.1371/journal.pone.0036627
- Urner F., Sacas D. 1999. Characterization of glycolysis and pentose phosphate pathway activity during sperm entry into the mouse oocytes. **Biology of Reproduction**. 60:973-978.
- Van Soom A., Mateusen B., Leroy J., De Kruif A. 2003. Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? **Reproductive BioMedicine Online** 7:664-670.
- Vandaele L., Mateusen B., Maes D. De Kruif A., Van Soom A. 2006. Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility?. **Theriogenology** 65:1691-1703.
- Verberckmoes S., Soom A., De Pauw I., Dewulf A., De Kruif A. 2002. Migration of bovine spermatozoa in a synthetic medium and its relation to in vivo bull fertility. **Theriogenology** 58:1027-1037.
- Walters A., Eyestone W., Saacke R., Pearson R., Gwazdauskas F. 2004. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology** 25:554-563.
- Walters A., Saacke R., Pearson R., Gwazdauskas F. 2005. The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. **Theriogenology** 64:1404-1421.
- Ward F., Rizos D., Boland M., Lonergan P. 2003. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: word in progress. **Theriogenology** 59:1575-1584.
- Ward F., Rizos D., Corridan D., Quinn K., Boland M., Lonergan P. 2001. Paternal influence on time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development** 60:47-55.
- Ward W., Kishikawa H., Akutsu H., Yanagimachi H., Yanagimachi R. 2000. Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. **Zygote** 8:51-56.
- Warzych E., Peippo J., Szydłowski M., Lechniak D. 2007. Supplements to in vitro maturation media effect the production of bovine blastocyst and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. **Animal Reproduction Science** 97:334-343.
- Wrathall A., Simmons H., Van Soom A. 2006. Evaluation of risk of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilization with virus-infected semen. **Theriogenology** 65:247-274.
- Yadav B., King W., Betteridge K. 1993. Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated in vitro. **Molecular Reproduction and Development** 36:434-439.
- Zhao M., Shirley C., Yu Y., Mohapatra B., Zhang Y., Unni E., Deng J., Arango N., Terry N., Weil M., Russell L., Behringer R., Meistrich M. 2001. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. **Molecular and Cellular Biology** 21:7243-7255.
- Zidi-Jrah I., Hajlaoui A., Mougou-Zerelli S., Kammoun M., Meniaoui I., Sallem A., Brahem S., Fekih M., Bibi M., Saad A., Ibala-Romdhane S. 2016. Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. **Fertility and Sterility** 105:58-64.