



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Aportaciones a la Crioconservación de Gametos
Masculinos en la Raza Bovina Murciano Levantina:
Recongelación de Espermatozoides

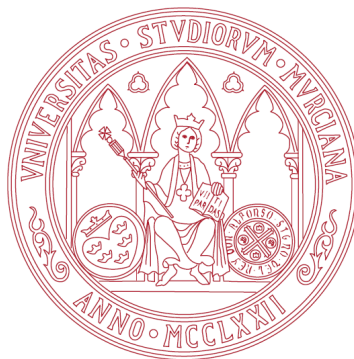
**Dña. Laura Almela Veracruz
2014**

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa Doctorado Mención de Excelencia

“Biología y Tecnología de la
Reproducción en mamíferos”



TESIS DOCTORAL

**Aportaciones a la crioconservación
de gametos masculinos en la raza
bovina Murciano Levantina:
recongelación de espermatozoides**

Laura Almela Veracruz

2014



D^a. RAQUEL ROMAR ANDRÉS, Profesora Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA y Presidenta de la Comisión Académica del Programa de Doctorado “BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN MAMÍFEROS”, INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos en la raza bovina Murciano Levantina: recongelación de espermatozoides”, ha sido realizada por D^a LAURA ALMELA VERACRUZ, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. ANGEL POTO REMACHA, D^a BEGOÑA PEINADO RAMÓN y D. SALVADOR RUIZ LÓPEZ, y que la Comisión Académica ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia a 4 de Noviembre de 2014

D. ÁNGEL POTO REMACHA, Investigador del Equipo de Mejora Genética Animal del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos en la raza bovina Murciano Levantina: recongelación de espermatozoides*”, realizada por D^a. LAURA ALMELA VERACRUZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia

Murcia a 4 de Noviembre de 2014

**D^a. BEGOÑA PEINADO RAMÓN, Investigadora del Equipo de Mejora Genética Animal del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA),
AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos en la raza bovina Murciano Levantina: recongelación de espermatozoides*”, realizada por D^a. LAURA ALMELA VERACRUZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia

Murcia a 4 de Noviembre de 2014



D. SALVADOR RUIZ LÓPEZ, Profesor Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA en el Departamento de FISIOLÓGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos en la raza bovina Murciano Levantina: recongelación de espermatozoides*”, realizada por D^a. LAURA ALMELA VERACRUZ, bajo mi inmediata dirección y supervisión y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia

Murcia a 4 de Noviembre de 2014

Departamento de Fisiología
Facultad de Veterinaria

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 868 884 790 – F. 868 884 147 – www.um.es/grupo-fisiovet
e-mail: sruiz@um.es

Estar preparado es importante, saber esperar lo es aún más, pero aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida.

Arthur Schnitzler (1862-1931) Dramaturgo austríaco.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera que mis primeras palabras de agradecimiento fueran dirigidas a los directores de la presente tesis doctoral:

Al Dr. Ángel Poto Remacha, pues sin él esta tesis no habría sido posible. Mi más sincero agradecimiento por haber depositado su confianza en mí todos estos años, llenos de buenos y malos momentos.

A la Dra. Begoña Peinado Ramón, por su gran ayuda en la realización de este trabajo, pero también por su amistad y alegría.

Al Dr. Salvador Ruiz López, porque su dedicación y esfuerzo han sido indispensables para su realización.

También a mi familia y amigos, por los ánimos, ayuda y apoyo recibidos. A Cayetano, por el apoyo moral y por aguantar los malos momentos de forma estoica.

Al IMIDA, porque sin sus instalaciones y equipos tampoco habría sido posible la puesta en marcha de este proyecto. A David, por haberme sacado de más de un apuro informático. A Santi, por su ayuda con las búsquedas bibliográficas más complicadas.

Este trabajo se ha podido desarrollar gracias a la obtención de ayudas en diversos proyectos y, en concreto, al financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, bajo la coordinación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (Ref. RZ2010-00003-C2-00), proyecto coordinado entre el Equipo de Mejora Genética Animal del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA-Murcia) y el Grupo de Investigación “Fisiología de la Reproducción” de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

A todos aquellos ganaderos y no ganaderos propietarios, no sólo de los sementales utilizados para este estudio, sino del resto de razas autóctonas, porque gracias a personas como ellos, a su dedicación, esfuerzo y amor incondicional por la huerta de Murcia, se pueden seguir conservando las tradiciones y los recursos animales, ese gran tesoro genético.

Y en general, a todos aquellos que de una manera directa o indirecta han contribuido a que este trabajo haya podido ver la luz.

**PUBLICACIONES RELACIONADAS Y
DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL**

1. **Almela L**, Poto A, Galián S, Ruiz S, Romero J, Peinado B. Murcia se esfuerza por la supervivencia de su raza bovina autóctona. *Albéitar*. 143: 18-20. 2011.
2. **Almela L**, Peinado B, Poto A. Relación entre la consanguinidad y la reproducción en la vaca Murciano-Levantina. *VIII Congreso Ibérico Recursos Genéticos Animais*. Évora (Portugal). P. 58. 2012.
3. **Almela L**, Peinado B, Poto A. Relación entre la consanguinidad y la reproducción en la vaca Murciano-Levantina. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 3: 41-45. 2013.
4. **Almela L**, Peinado B, Ruiz S. Influencia del donante de semen en la recongelación de espermatozoides bovinos de raza Murciano-Levantina. *IX Congreso Ibérico Recursos Genéticos Animales*. Palencia. 2014.
5. **Almela L**, Ruiz S, Peinado B. Estudio comparativo de la fertilidad *in vitro* del semen de toro Murciano-Levantino sometido a dos procesos diferentes de recongelación espermática. *IX Congreso Ibérico Recursos Genéticos Animales*. Palencia. 2014.
6. Astiz S, Romero-Aguirregomezcorra J, Poto A, **Almela L**, Peinado B, Ruiz S. Primera ternera murciano-levantina nacida, obtenida por biotecnologías reproductivas (OPU, fecundación *in vitro*, cultivo *in vitro* y vitrificación). *Boletín ANEMBE*. 98: 19-20. 2012.
7. Azevedo J, Peinado B, **Almela L**, Galián S, Ruiz S, Romero J, Poto A. Criocongelación de semen de toro Murciano-Levantino usando un diluyente a base de fosfolípidos vegetales. Comparación con las técnicas tradicionales de la calidad del semen descongelado. *XIV Jornadas da Associação Portuguesa de Buiatria*. Elvás (Portugal). 2010.

8. Galián S, **Almela L**, Peinado B, Azevedo J, Ruiz S, Romero J, Poto A. Actuaciones en el banco de germoplasma de la raza bovina Murciano-Levantina. *FEAGAS*. 36: 131-135. 2010.
9. Peinado B, Galián S, **Almela L**, Poto A. Estudio morfométrico de la vaca Murciano-Levantina. Situación actual. *II Congreso Nacional de Zootecnia*. Lugo. Pp. 229-232. 2010.
10. Peinado B, **Almela L**, Poto A. Situación genética actual de la raza bovina Murciano-Levantina. *VIII Congreso Ibérico Recursos Genéticos Animais*. Évora (Portugal). P. 77. 2012.
11. Peinado B, **Almela L**, Poto A. Situación genética actual de la raza bovina Murciano-Levantina. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 3: 46-50. 2013.
12. Poto A, **Almela L**, Galián S, Peinado B. Caracterización etnomorfológica de las especies animales autóctonas de la Región de Murcia. *II Congreso Nacional de Zootecnia*. Lugo. P. 228. 2010.
13. Poto A, Romero J, Peinado B, Ruiz S, **Almela L**. La conservación de la raza bovina Murciano Levantina. *COAG-Iniciativa Rural*. 41: 16-19. 2011.
14. Poto A, **Almela L**, Peinado B, Romero-Aguirregomezcorra J, Ruiz S. Aplicación de numerosas técnicas reproductivas para la obtención de un ternero Murciano-Levantino. *VIII Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animais*. Évora (Portugal). P. 72. 2012.
15. Poto A, **Almela L**, Peinado B, Ruiz S. Respuesta a las técnicas reproductivas de las razas en peligro de extinción. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 3: 29-40. 2013.

16. Romero J, De Ondiz A, **Almela L**, Poto A, Ruiz S. Evaluación de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* bovino. *XV Congreso Internacional ANEMBE*. Granada. Pp. 210-212. 2010.
17. Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz S, **Almela L**, Peinado B, Poto A, Ruiz S. FSH (Pluset[®]) stimulation protocol followed by ovum pick-up on the Murciano-Levantina breed recovery program. *XXVII World Buiatrics Congress*. Lisboa (Portugal). P. 190. 2012.
18. Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz S, Poto A, **Almela L**, Peinado B, Ruiz S. Primera ternera Murciano-Levantina obtenida por biotecnología reproductiva (OPU, fecundación *in vitro*, cultivo *in vitro* y vitrificación de embriones). *XVIII Congreso Internacional ANEMBE*. Lérida. Pp. 229-230. 2013.
19. Ruiz S, Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz S, Peinado B, **Almela L**, Poto A. Application of reproductive biotechnology for the recovery of endangered breeds: Birth of the first calf of Murciana-Levantina bovine breed derived by OPU, *in vitro* production and embryo vitrification. *Reprod Dom Anim*. 48: 81-84. 2013.
20. Ruiz S, Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz S, Peinado B, **Almela L**, Poto A. Birth of the first calf of Murciana-Levantina bovine breed derived by OPU, *in vitro* production and embryo vitrification. *29th Scientific Meeting AETE*. Estambul (Turquía). Pp. 200-201. 2013.
21. Ruiz S, Sánchez JM, Rojas E, Romero-Aguirregomezcorta J, **Almela L**, Peinado B, Poto A. Conservación de la raza bovina Murciano-Levantina: OPU y su repercusión en la fertilidad tras la inseminación artificial a tiempo fijo. *XIX Congreso Internacional ANEMBE*. Oviedo. Pp. 359-361. 2014.
22. Ruiz S, Romero-Aguirregomezcorta J, **Almela L**, Peinado B, Poto A, Astiz S. OPU and its impact in fertility after time fixed artificial insemination in a conservation program of Murciano-Levantine bovine breed. *30th Scientific Meeting AETE*. Dresde (Alemania). Pp. 162-163. 2014.

ÍNDICE

1. Introducción, Hipótesis y Objetivos	1
1.1. Introducción	2
1.2. Hipótesis	7
1.3. Objetivos	8
2. Revisión Bibliográfica	10
2.1. Antecedentes de la conservación y mantenimiento de la Biodiversidad	11
2.2. La Biodiversidad de los animales domésticos en la Región de Murcia	14
2.3. Historia de la raza bovina Murciano Levantina	15
2.4. Programa de mejora y conservación de la raza bovina ML	18
2.4.1. Banco de Germoplasma	19
2.5. Conservación del semen bovino	21
2.5.1. Manejo de sementales bovinos	21
2.5.2. Sistemas de recogida de semen	22
2.5.2.1. Vagina artificial	22
2.5.2.2. Electroeyaculación	23
2.5.2.3. Lavado del epidídimo y vías deferentes	23
2.5.3. Valoración del eyaculado bovino	24
2.5.3.1. Valoración macroscópica: color, olor y volumen	25
2.5.3.2. pH	26
2.5.3.3. Índices bioquímicos	27
2.5.3.4. Concentración espermática	27
2.5.3.5. Motilidad espermática	29
2.5.3.5.1. Motilidad masal	29
2.5.3.5.2. Motilidad progresiva o individual	30
2.5.3.6. Vitalidad espermática	32
2.5.3.6.1. Tinción vital	32
2.5.3.6.2. Tests de resistencia	33
2.5.3.6.3. Estudio de vitalidad espermática mediante fluorocromos	34
2.5.3.7. Estudio del acrosoma	36
2.5.3.8. Estudio de la cromatina	37
2.5.3.9. Estudio de morfoanomalías	39
2.5.4. Criopreservación de semen bovino	40
2.5.4.1. Diluyentes	44
2.5.4.2. Crioprotectores	50
2.5.4.3. Concentración espermática de dosis seminales	55
2.5.4.4. Sistemas de envasado	57
2.5.4.5. Curvas de temperatura	58
2.5.4.6. Almacenamiento de dosis seminales	61

2.5.4.7. Descongelación	63
2.6. Recongelación espermática	64
3. Material y Métodos	67
3.1. Animales	68
3.2. Obtención de semen: electroeyaculación	69
3.3. <i>Experiencia 1.</i> Parámetros seminales en toros de raza ML	69
3.3.1. Color, olor, volumen y pH	69
3.3.2. Concentración espermática	70
3.3.3. Motilidad espermática masal	70
3.3.4. Vitalidad	71
3.3.4.1. Porcentaje de espermatozoides vivos y motilidad individual	71
3.3.4.2. Tinción vital: integridad de membrana	71
3.4. Métodos de dilución y conservación del semen de toro ML	72
3.4.1. Diluyentes	72
3.4.2. Crioprotectores	73
3.4.3. Concentración espermática de dosis seminales	74
3.4.4. Identificación de envases seminales (pajuelas)	75
3.4.5. Sistema de envasado seminal	75
3.4.6. Curva de temperatura	76
3.4.7. Almacenamiento de dosis seminales	76
3.4.8. Descongelación	76
3.5. <i>Experiencia 2.</i> Valoración de la calidad del semen congelado y recongelado	77
3.5.1. Porcentaje de espermatozoides vivos y motilidad individual	77
3.5.2. Test de resistencia espermática	77
3.5.3. Estudio del acrosoma	78
3.5.4. Estudio de la cromatina	79
3.5.5. Estudio de morfoanomalías espermáticas	80
3.5.6. Métodos de recongelación de semen descongelado	81
3.5.6.1. Agresión seminal máxima (semen recongelado con tratamiento previo - CT)	81
3.5.6.2. Agresión seminal mínima (semen recongelado sin tratamiento previo - ST)	82
3.5.7. Valoración del eyaculado bovino post-recongelación	82
3.6. <i>Experiencia 3.</i> Uso de la IA para la valoración de la fertilidad del semen recongelado	83
3.7. Diseño experimental	84
3.7.1. <i>Experiencia 1.</i> Parámetros seminales en toros de raza ML	84
3.7.1.1. Determinación del color, olor, volumen y pH	84
3.7.1.2. Determinación de concentración espermática	85

3.7.1.3. Determinación de dosis totales y por eyaculado	85
3.7.2. <i>Experiencia 2.</i> Recongelación espermática CT y ST.	
Valoración de la calidad espermática del semen congelado y recongelado	85
3.7.2.1. Recongelación espermática CT	85
3.7.2.2. Recongelación espermática ST	85
3.7.2.3. Porcentaje de espermatozoides vivos y motilidad individual	86
3.7.2.4. Test de resistencia espermática	86
3.7.2.5. Integridad de membrana	87
3.7.2.6. Estudio del acrosoma	87
3.7.2.7. Estudio de la cromatina	87
3.7.2.8. Estudio de morfoanomalías espermáticas	87
3.7.3. <i>Experiencia 3.</i> Uso de la IA para la valoración	
de la fertilidad del semen recongelado	88
3.8. Análisis estadístico	88
4. Resultados	90
4.1. <i>Experiencia 1.</i> Parámetros seminales en toros de raza ML	91
4.1.1. Color y pH	91
4.1.2. Volumen seminal	91
4.1.3. Concentración espermática	92
4.1.4. Dosis seminales	93
4.2. <i>Experiencia 2.</i> Valoración de la calidad del semen congelado y recongelado	96
4.2.1. Motilidad individual del semen congelado y recongelado	96
4.2.2. Porcentaje de espermatozoides vivos en semen congelado y recongelado	97
4.2.3. Motilidad individual en test de resistencia espermática	
del semen congelado y recongelado	99
4.2.4. Porcentaje de espermatozoides vivos en test de resistencia	
en semen congelado y recongelado	103
4.2.5. Integridad de la membrana plasmática	
en semen congelado y recongelado	106
4.2.6. Estudio de los acrosomas	
en semen congelado y recongelado	112
4.2.7. Estudio de la cromatina en semen congelado y recongelado	115
4.2.8. Estudio de morfoanomalías espermáticas	
en semen congelado y recongelado	117
4.3. <i>Experiencia 3.</i> Uso de la IA para la valoración	
de la fertilidad del semen recongelado	131
5. Discusión	133
5.1. <i>Experiencia 1.</i> Parámetros seminales en toros de raza ML	134

5.2. <i>Experiencia 2.</i> Valoración de la calidad del semen congelado y recongelado	140
5.2.1. Motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos en semen congelado y recongelado	140
5.2.2. Test de resistencia espermática en semen congelado y recongelado	145
5.2.3. Estudio de la integridad de la membrana espermática en semen congelado y recongelado	147
5.2.4. Estudio de los acrosomas en semen congelado y recongelado	148
5.2.5. Estudio de la cromatina espermática en semen congelado y recongelado	150
5.2.6. Estudio de morfoanomalías espermáticas en semen congelado y recongelado	151
5.3. <i>Experiencia 3.</i> Uso de la IA para la valoración de la fertilidad del semen recongelado	154
6. Conclusiones	159
7. Resumen	161
8. Summary	164
9. Abreviaturas	167
10. Bibliografía	169

1. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

La biodiversidad es el conjunto de toda la vida en nuestro planeta, que incluye la riqueza de especies, de ecosistemas y de los complejos procesos ecológicos que relacionan todos estos componentes entre sí. La diversidad biológica resulta clave para el sostenimiento de la vida tal y como hoy la conocemos. De ahí que todas las acciones dirigidas a preservar especies y razas son importantes para evitar que se produzca la pérdida permanente de su material genético (Souza *et al.*, 2011).

En las últimas décadas existe una gran preocupación por el mantenimiento de la biodiversidad, en un intento de proteger la naturaleza de la continua agresión que la actividad humana genera sobre nuestro entorno. Son numerosos los informes sobre la extinción de variedades, especies y razas, tanto en el mundo vegetal como en el animal. Esta agresión sobre la biodiversidad está preocupando porque, en definitiva, el futuro de todas las especies, incluida la humana, depende del equilibrio existente en la naturaleza entre los distintos ciclos o cadenas que componen la vida en general. Además, el actual deterioro de la biodiversidad es en gran parte responsabilidad del ser humano, consecuencia de factores tales como el cambio climático, el crecimiento acelerado de la población, la erosión genética, la transformación de los hábitats naturales, la sobreexplotación de especies, la contaminación de los ecosistemas, la introducción de especies invasoras, así como el uso no sostenible de los recursos naturales (Holt y Pickard, 1999).

En la segunda mitad del siglo XX surgió la necesidad de abastecer de alimentos a la población, en una demanda consecuencia de los desastres producidos por las guerras del medio siglo anterior. En el mundo de la ganadería se impulsó el uso de razas altamente seleccionadas con gran capacidad y velocidad de crecimiento, altos niveles productivos y un aprovechamiento muy eficiente de alimentos de alto valor biológico; a lo que se unió la introducción de tecnología agraria que eliminaba o minimizaba el factor tierra de los medios de producción, cayendo en desuso las viejas técnicas basadas en la fuerza animal como medio productivo. Todo ello en perjuicio de

las razas locales que, aunque bien adaptadas al medio y a las producciones, no alcanzaban los rendimientos necesarios para competir con los rendimientos derivados de las razas mejoradas o de sus cruces; por ello, las razas animales autóctonas fueron arrinconadas y/u olvidadas, extinguiéndose gran parte de ellas. Efectivamente, las razas autóctonas están ya desapareciendo y el tamaño de la población efectiva de muchas razas de ganado está por debajo del umbral que aseguraría su sostenibilidad a largo plazo (Taberlet *et al.*, 2011). De 7.600 razas de animales de granja existentes, 1.500, lo que supone el 20%, están declaradas en peligro de extinción. En todo el mundo se extingue una raza al mes, habiéndose erradicado, en los últimos 15 años, unas 190; y en los últimos 5 años, han desaparecido 60 razas de cabras, cerdos, caballos y aves de corral (FAO, 2006).

A partir de finales del siglo XX, varias instituciones advirtieron sobre el problema creado por el uso de un bajo número de razas animales en los distintos programas productivos. En el bovino de leche se da el caso de que una única raza (*Holstein*) produce prácticamente toda la leche consumida en el mundo, y además, solo unos pocos toros de ciertas estirpes de ganado frisón han sido utilizados como reproductores, dado el nivel tecnológico al que se ha llegado en la reproducción dirigida en el ganado bovino. Lo mismo ha venido ocurriendo en el sector de la producción de carne porcina o aviaria, donde se utilizan sólo algunas estirpes de menos de diez razas para obtener toneladas de carne. Según la FAO, 14 razas de animales de producción proporcionan actualmente el 90% de los alimentos consumidos. Todo ello, ha logrado alertar al mundo científico por el peligro que supone el aumento anual de la consanguinidad y, por ende, la aparición de efectos genéticos perjudiciales y potencialmente permanentes como consecuencia de este aumento de homocigosis en todas las poblaciones. De esta forma aparecen carnes poco apetecibles; las conocidas como pálidas, blandas y exudativas (PSE) ligadas al gen halotano son una muestra de ello; o el gen *Napole*, causante del exceso de humedad en las carnes y productos derivados del porcino. Otras consecuencias de la consanguinidad provocan alteraciones en la fisiología reproductiva de los individuos, tales como una reducción en el número de

espermatozoides fértiles o en la capacidad de la hembra para mantener gestaciones normales (Holt y Pickard, 1999).

La importancia de preservar la biodiversidad de nuestro planeta ha sido ampliamente reconocida y se han propuesto varias estrategias para la protección y conservación de la flora y fauna del globo, promovidas por diversos organismos internacionales como la *International Union for Conservation of Nature (IUCN)*, que publica la denominada “*Red List*”, reconocida a nivel mundial, como la mayor aproximación para la evaluación del estado de conservación de las especies animales y en la que se incluyen por ejemplo, un total de 5.488 especies de mamíferos. En esta lista, las especies se clasifican en varias categorías entre las que destacan las de especies “extinguidas” (*extinct*), “en peligro de extinción” (*endangered*), y “amenazadas” (*threatened*), considerándose estas últimas como aquellas que pueden estar en peligro de extinción en un futuro próximo.

En el marco de la FAO, se está desarrollando la Estrategia Global para los Recursos Genéticos de Animales de Granja, encaminada a la conservación y utilización sostenible de los recursos genéticos de interés agroalimentario, canalizada a través de diversos acuerdos, mediante el compromiso suscrito por diversos países, tras la firma del Instrumento de Ratificación de 16 de noviembre de 1993 del “Convenio sobre la Diversidad Biológica” (Río de Janeiro, Brasil), de 5 de junio de 1992 y posteriormente, en la “Conferencia Técnica Internacional sobre los Recursos Zoogenéticos para la Alimentación y la Agricultura” de 2007 en Interlaken (Suiza), o la última reunión “*14th Regular Session*” de 2013 celebrada en Roma (Italia), donde se mantenían y mejoraban las actuaciones de conservación. Asimismo, en la Unión Europea (UE) ya se han abordado las bases para orientar las líneas de trabajo en el mantenimiento de estos recursos genéticos de interés agroalimentario, al tiempo que se dispone de legislación comunitaria para garantizar el libre comercio de los animales de raza y su material genético, y se han armonizado los criterios para el reconocimiento de las asociaciones de criadores, la inscripción de reproductores de raza en los libros genealógicos, su admisión para la cría y las pautas para el control de rendimientos y evaluación del valor

genético de las diferentes especies. En España, esta situación queda bajo el amparo legal del *Real Decreto 2129/2008*, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas.

En la Región de Murcia, comunidad autónoma de pequeña dimensión, siempre ha existido una amplia variedad de razas animales, que en muchos de los casos goza de fama nacional e internacional. La situación geográfica ha proporcionado a esta región un carácter fuertemente fronterizo, siendo influida por los distintos reinos que durante siglos fueron sus vecinos; con el reino de Aragón en el este, donde aún quedan algunos vestigios de su existencia fronteriza; y los reinos Nazaríes en el lado opuesto, con los que siempre hubo un gran comercio, sobre todo en ganado bovino de tracción y laboreo agrícola. También el Mediterráneo, a través de los puertos de Águilas, Mazarrón y Cartagena, aportó la influencia de muy distintos países situados en la cuenca marina. Finalmente, la pertenencia de Murcia a Castilla la hizo receptora de todo el conjunto de usos y costumbres del resto de la península Ibérica.

En el área de la ganadería, durante los últimos siglos han destacado como de origen murciano la *raza caprina Murciano-Granadina*, de aptitud lechera y productora, además, de cabritos de gran calidad gastronómica; la *oveja Segureña*, que proporciona corderos muy demandados en todo el ámbito nacional. Estas dos razas están siendo muy utilizadas y actualmente no se encuentran en peligro de extinción. Otras razas que aún se mantienen en las áreas de producción ganadera son el *cerdo Chato Murciano*, productor de transformados cárnicos excelentes y responsable del aporte de materia prima a la importante industria agroalimentaria desarrollada en el sudeste español; y que en los últimos cien años fue muy demandado, pero que en la actualidad se encuentra en peligro de extinción, con alguna esperanza de recuperación por los programas que se han venido implementando desde finales del siglo pasado. La *gallina Murciana* es otro de los recursos genéticos propios en peligro de la Región que figuran en el Catálogo Oficial de Razas Animales, que en su día aportaba alimentos propios de sus aptitudes, producción de carne y huevos, y que en la actualidad también se utiliza como ornato por la belleza de

sus ejemplares. Finalmente, otros recursos raciales como el *palomo Deportivo* o *de Pica de Murcia*, el *gusano de seda*, el *pavo Negro del Mediterráneo* y el *perro Ratonero*, junto con la raza *bovina Murciano Levantina*, de la que trata este estudio, completan el elenco de razas animales que conforman el patrimonio genético ganadero de Murcia, fruto del esfuerzo de los huertanos y labradores de todas las comarcas de nuestra región (Poto y Peinado, 1999).

La raza bovina Murciano Levantina (ML) (*Fig. 1*), como se ha comentado anteriormente, también forma parte de los recursos genéticos con origen en Murcia, habiendo sido muy estimada por su aptitud como animal traccionador en las labores agrícolas y de transporte de mercancías. Con la llegada, en la segunda mitad del siglo XX, de la tecnología agraria avanzada fue abandonándose su uso, siendo postergada como recurso genético, puesto que otras posibles aptitudes no fueron competitivas con las grandes razas productoras de leche y carne del sector bovino. Por lo tanto, y mientras continúe esta situación, se ha incluido esta raza en el Catalogo Español de Recursos Genéticos Animales estando dentro del grupo de razas amenazadas o en peligro de extinción. También se encuentra en el sistema informático del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, conocido como ARCA, donde se le considera como raza en punto crítico de extinción, con un censo mantenido cercano a los 60 ejemplares (Poto *et al.*, 2011).



Figura 1: Toro de raza ML.

En los últimos diez años se han realizado varios proyectos de conservación de la raza ML, tanto *in vivo* como *in vitro*, en un intento de combinar las actividades de los animales mantenidos en pequeñas explotaciones, con la obtención de muestras de gametos dirigidos al Banco de Germoplasma de la raza ML. Además, estos proyectos han venido implementando técnicas novedosas para su aplicación en el mantenimiento eficaz *in vitro* de espermatozoides para su utilización en el programa de conservación *in vivo* mediante inseminación artificial (IA) y el estudio de nuevas alternativas en el uso de estos gametos que en el futuro puedan requerirse, como son: la disminución del número de espermatozoides útiles por dosis para destinarlos a fecundación *in vitro* (FIV), la recongelación de dosis seminales que permitan aplicar las técnicas de separación de sexo en los gametos masculinos y, como técnica de predicción de la fertilidad de las dosis almacenadas en el Banco de Germoplasma de esta raza bovina (Poto *et al.*, 2011).

1.2. Hipótesis

El Banco de Germoplasma de la raza bovina ML contiene material genético suficiente para realizar acciones de conservación *in vitro* que permitan en la actualidad mantener esta raza *in vivo* mediante IA en las granjas de los criadores, o bien recuperarla en el futuro en caso de pérdida o extinción de los animales vivos. Este material genético se mantiene criopreservado mediante almacenamiento en contenedores de nitrógeno líquido (N₂L), al que se le han aplicado diversas técnicas convencionales de predicción de su fertilidad. Por varias razones, entre las que destacan las de tipo económico, se hace necesario disminuir la cantidad de dosis seminales, manteniendo la posibilidad de recuperar la raza de forma objetiva, en el momento que se desee.

Mediante la aplicación de técnicas de recongelación seminal se pueden mantener *in vitro* espermatozoides manipulados por diversas técnicas destinadas a aumentar la eficacia de los procesos de recuperación racial, como es la utilización de dosis seminales de espermatozoides sexados. Con ello, el tiempo de recuperación racial y el mantenimiento de dosis seminales se

verán reducidos a la mitad con la consiguiente disminución del gasto. Además, los toros con mejor fertilidad *in vitro* a la recongelación serán los que presenten mejores resultados en el proceso de IA con semen congelado. Pudiendo ser los sementales catalogados e indexados según los parámetros del espermograma del semen recongelado.

Por lo tanto, la aplicación de técnicas de recongelación en espermatozoides manipulados por técnicas actualizadas como por ejemplo, la citometría de flujo, pueden mejorar las condiciones de mantenimiento del Banco de Germoplasma de la raza bovina ML con la consiguiente reducción de los costes derivados de su mantenimiento a largo plazo.

1.3. Objetivos

Son varios los objetivos que se pretenden con la puesta a punto de este estudio, pero el objetivo general es el de asegurar el mantenimiento del recurso genético, Raza Bovina Murciano Levantina, mediante la recongelación de espermatozoides procedentes de toros de la raza ML.

Como objetivos específicos para la conservación de la raza ML, tenemos:

1) El estudio de la recongelación de espermatozoides descongelados como técnica predictora de fertilidad de dosis seminales de ganado bovino ML.

2) La puesta a punto de una técnica de recongelación que permita la criopreservación de dosis seminales descongeladas, a las que se le aplique un manejo tecnológico que permita mejorar alguna de sus cualidades.

Es necesario comentar que al encontrarse la raza ML en un punto crítico de extinción, el número de ejemplares utilizados en este estudio es limitado, además de no ser contemporáneos entre ellos.

Parte de los resultados que aquí se presentan han sido publicados parcialmente en revistas y presentados a diversos congresos nacionales e internacionales, referenciados en el manuscrito. De igual manera, se debe constar que la realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la obtención de ayudas en diversos proyectos y, en concreto, al financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, bajo la coordinación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (Ref. RZ2010-00003-C02), proyecto coordinado entre el Equipo de Mejora Genética Animal del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA-Murcia) y el Grupo de Investigación “Fisiología de la Reproducción” de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes de la conservación y mantenimiento de la Biodiversidad

La *Biodiversidad* o *diversidad biológica* es, según el Convenio Internacional sobre la Diversidad Biológica, el término por el que se hace referencia a la amplia variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que la conforman, resultado de miles de millones de años de evolución según procesos naturales y también de la influencia creciente de las actividades del ser humano. La biodiversidad comprende igualmente la variedad de ecosistemas y las diferencias genéticas dentro de cada especie que permiten la combinación de múltiples formas de vida, y cuyas mutuas interacciones con el resto del entorno fundamentan el sustento de la vida sobre el planeta.

El término «biodiversidad» es una traducción literal del inglés «*biodiversity*», y a su vez, es la contracción de la expresión «*biological diversity*», utilizada por primera vez en 1986 en el título de una conferencia, en la *National Forum on BioDiversity*, convocada por *W.G. Rosen*, a quién se le atribuye la idea de este concepto.

La biodiversidad la encontramos dividida entre los reinos vegetal y animal. El estudio que aquí presentamos es relativo a una pequeña pero muy importante parte de ese biodiverso mundo animal, el referido a los animales de granja o de abasto, a los animales destinados a satisfacer otras necesidades no alimenticias de los humanos como son las mascotas, a los animales de defensa y guarda, y a los dedicados a eventos deportivos. Dentro de este grupo biodiverso se encuentran las diferentes razas animales especializadas, adaptadas y seleccionadas con intervención humana para las producciones ganaderas.

. A mediados del siglo XX se celebran diversas reuniones en Chicago y Bolonia, Simposio de Recursos sobre Germoplasma y 2ª Conferencia Europea Avícola, respectivamente (Rodero *et al.*, 1994). El proceso de preocupación y llamada de atención sobre la pérdida de razas animales, tiene su apogeo en los

años ochenta y noventa del pasado siglo por iniciativa de la Organización para la Alimentación y la Agricultura, dependiente de Naciones Unidas (FAO). Este proceso culmina con la firma del protocolo de la Conferencia de la Biodiversidad (Río de Janeiro, 1992); protocolo aprobado por los jefes de estado de 108 países, al que se adhirieron con su firma más de 150 países; en la actualidad, 192 países han ratificado ya dicho convenio.

Existen razas en riesgo que en otro tiempo fueron imprescindibles para la producción en medios rurales, riesgo que se centra en la consanguinidad por tratarse de poblaciones muy pequeñas con apareamientos familiares. Las alteraciones que se producen ponen en situación crítica a las razas animales y, por tanto, a la biodiversidad, comprometiendo así los sistemas productivos. Por ello, resulta necesario mantener y conservar los recursos genéticos animales, no sólo por lo descrito anteriormente, sino también por otras consideraciones tan o más importantes, como son las referidas por Orozco (1985):

1. *Consideraciones de tipo cultural:* Las razas conservadas a lo largo del tiempo son valiosos recuerdos de la naturaleza y la cultura. Hace más de 40.000 años que comenzaron a domesticarse los animales, y este proceso ha dejado una cantidad ingente de material de estudio histórico y tecnológico.

2. *Consideraciones biológicas:* Las razas han sido hechas por el hombre, de forma consciente o inconsciente, aunque con la intervención del medio, actuando a través de la selección natural; y es por esto, por lo que sólo se habla de raza en el caso de animales domésticos. La conservación reduce el riesgo de la pérdida de genes, mantiene la variabilidad y flexibilidad genética y, finalmente, supera los límites de la selección.

3. *Consideraciones de tipo práctico:* Conservando y utilizando en el momento adecuado se produce una mejora selectiva de animales, obteniéndose ejemplares más adaptados al medio, cubriendo las necesidades futuras y cambiantes de los consumidores, mediante cruzamientos con razas mejoradas, innovando productos y buscando genes de mayor interés para otras producciones.

4. *Consideraciones de tipo científico*: La conservación posibilita la investigación de los hechos evolutivos y se da paso a una eficaz estimación del progreso genético. Los recursos genéticos son un buen material de estudio en el área de la enseñanza.

La conservación de los recursos genéticos tiene diversas posibilidades según el entorno donde se ubique el material genético a conservar (Oldenbroek, 1999). Si el recurso son animales vivos que son explotados por los ganaderos en el mismo ambiente en el que siempre han sido utilizados, y donde expresan las aptitudes que les caracterizan, entonces se habla de **conservación *in situ***.

Cuando los criadores o ganaderos ya no son los que manejan la raza porque las circunstancias la han hecho poco rentable o las aptitudes productivas que las caracterizan ya no son demandadas por los consumidores, se hace imprescindible la conservación en parques o zoológicos, fuera de los lugares habituales donde se obtenían sus producciones, siendo aprovechados estos recursos genéticos como material didáctico de tipo cultural, histórico o ecológico. En este caso se denomina **conservación *ex situ in vivo***.

Existen casos en que la población animal es tan vulnerable desde el punto de vista numérico que se hace imprescindible la utilización tecnológica de la criopreservación. Ésta puede ser realizada a partir de células haploides (espermatozoides y ovocitos) o de recursos diploides, como es el caso de la congelación de embriones; a este sistema se le conoce como **conservación *ex situ in vitro***. Los organismos internacionales (FAO, 1998) están aconsejando que para la preservación de una raza se combinen varios tipos (*in vivo*, *in vitro*); además, estos sistemas son acompañados del almacenamiento de material genético de dichas razas (ADN, células somáticas, etc.).

2.2. La Biodiversidad de los animales domésticos en la Región de Murcia

Casi todas las especies ganaderas tienen su representante racial en la cabaña murciana, siendo su grado de aportación a la producción final agraria muy distinta, tanto según su grado de utilización como el momento en que se utilizaron. Siguiendo la importancia en la producción final ganadera de la especie de referencia, vemos que el ganado porcino estuvo representado por dos razas que se conocen originarias de Murcia: el cerdo Murciano Primitivo, raza desaparecida en la década de los años sesenta, perteneciente al tronco Ibérico, también conocido como cerdo Negro del Mediterráneo, cerdo Gabano o Pintado, según fuera el color de la variedad (negro o con pintas rojas). De estas variedades surgió el *cerdo Chato Murciano* por cruces con recursos genéticos porcinos traídos del exterior a principios del siglo XX (Panés, 1916; Peinado *et al.*, 2001; Poto *et al.*, 2002). Esta última raza está en peligro de extinción.

Los pequeños rumiantes tienen varios representantes raciales: la *raza ovina Segureña*, animal muy demandado en carnicería por la calidad de su carne y por los productores de ovino de Murcia, pues al tratarse de una región muy árida y con baja pluviometría, esta oveja aprovecha eficazmente los elementos fibrosos de los escasos pastos presentes en un terreno climatológicamente difícil; también se encuentran bastantes ejemplares de la *raza ovina Montesina*, pastando en las zonas de bajo monte de la comarca del Noroeste. Dentro de este grupo de pequeños rumiantes, la *cabra Murciano Granadina*, originada en el sudeste español, se presenta como un producto genético inigualable por sus altas producciones de leche, aportando una materia prima de gran calidad a la industria quesera surgida en Murcia al amparo de la demanda de consumidores exigentes de los derivados lácteos. La carne de cabrito es también muy estimada en todo el sureste. Estas razas de rumiantes contribuyen positivamente a la balanza económica de la ganadería.

La avicultura también tiene sus representantes genéticos en Murcia. La *gallina Murciana*, que en el pasado suministró elementos proteicos (carne y huevos) suficientes a las familias huertanas, se encuentra en la actualidad desplazada por los híbridos aviarios procedentes de las empresas

multinacionales de genética (Galián *et al*, 2006). De igual manera se encuentra el *pavo Negro del Mediterráneo*, muy demandado en las pedanías de la Huerta Murciana para el consumo de su carne en platos de gran tradición (Almela *et al.*, 2008a). Finalmente, el *palomo Deportivo o de Pica*, muy utilizado en eventos deportivos de relevancia en todo el levante, completa el elenco avícola autóctono (Almela *et al.*, 2008b; Duchi *et al.*, 2009).

El mundo canino también tiene su lugar con la *raza Ratonera de Murcia*, que en los últimos años se intenta recuperar por las sociedades caninas, que hacen un esfuerzo por mantener este recurso genético útil en las tareas de lucha contra los roedores. Otra especie que se utilizó en tiempos no muy lejanos, es el *gusano de seda*, actualmente estudiado como recurso autóctono; se cuenta además con varios representantes en el campo de la *helicultura*, demandados para su uso en platos típicos del área geográfica próxima al Mediterráneo.

Finalmente, hemos dejado para el último lugar a la raza objeto de este trabajo, la *raza bovina Murciana Levantina* (ML), dedicándole un apartado de mayor consideración.

2.3. Historia de la raza bovina Murciano Levantina

Entre el grupo de animales originarios de Murcia destacó la raza bovina ML, de gran interés debido a la aptitud como animal de tracción (*Fig. 2*), destinada a la realización de trabajo tanto en el ámbito rural como en el urbano. Así, se utilizaron en las labores de arado de los campos arroceros del norte de Murcia, sobre todo por la variedad racial conocida como *Calasparreña*. En la huerta se utilizó otra variedad de menor talla y especializada en las tareas de acondicionamiento del terreno bajo el arbolado, sobre todo en los cítricos, además del arado de huertos y transporte de frutas y hortalizas; era la variedad *Cristiana* o *Huertana*. En las comarcas mineras se desarrolló otra variedad denominada *Almazoreña*, cuya misión fue la del transporte de aperos de mina y de minerales. En el campo lorquino y en las huertas cercanas a la ciudad de Lorca se tenía otra variedad orientada a las tareas agrícolas, tanto de regadío

como de secano, que fue conocida con el nombre de vaca *Lorquina*. Algunos autores encuentran otra variedad utilizada en las zonas de sierra del norte de Murcia, conocida como vaca *Serrana*, aunque esta última no está claro que pertenezca a la raza (Panés, 1916; Sotillo y Serrano, 1985; Rodero *et al.*, 1994; Poto y Peinado, 1999; Peinado *et al.*, 2002a, b).

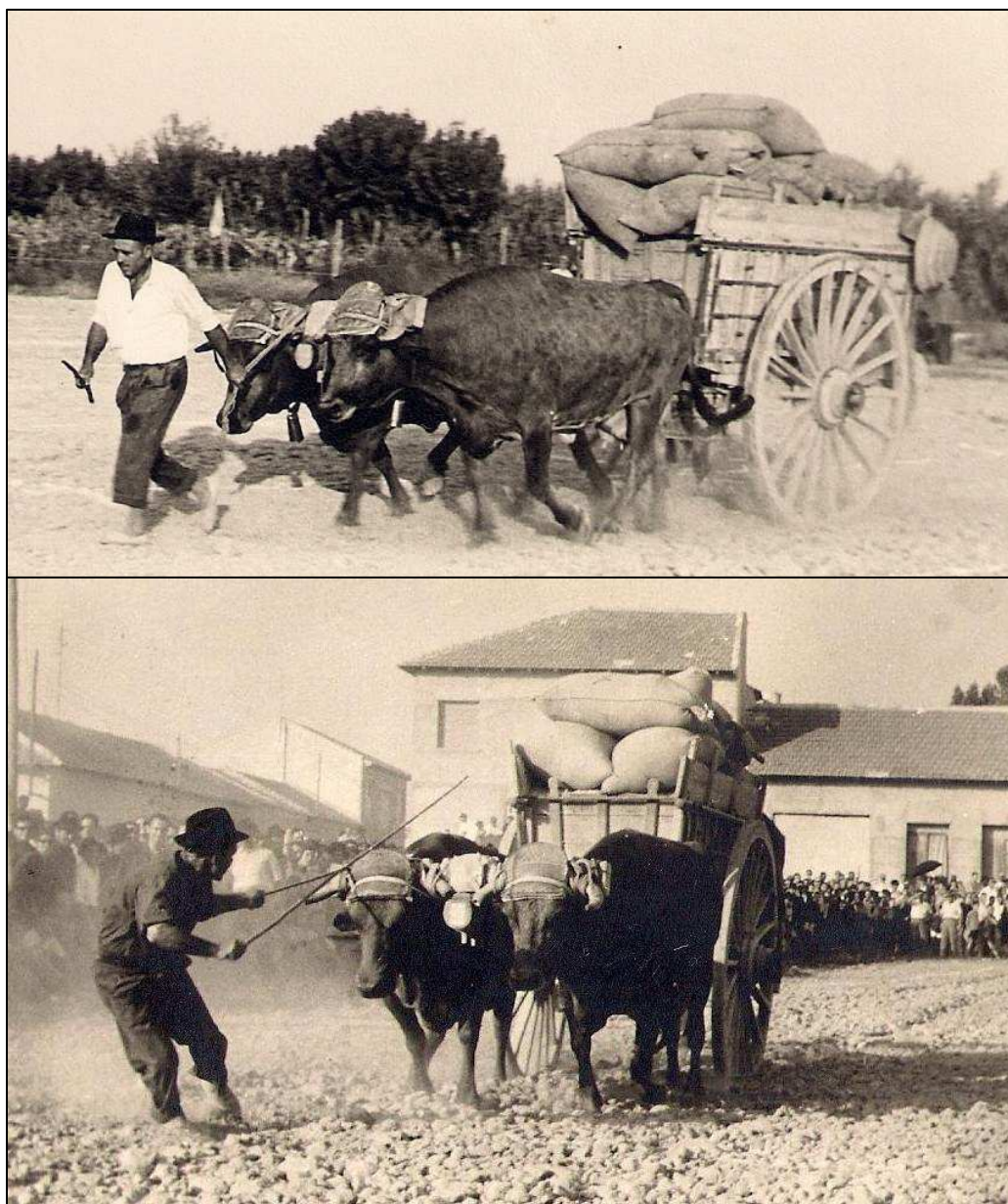


Figura 2. Dos parejas de vacas ML en labores de arrastre en festejos populares del siglo pasado.

Las vacas de raza ML que aún quedan (**Tabla 1**) son utilizadas en festejos populares (*Fig. 3*), patrocinados por ayuntamientos y asociaciones culturales, contribuyendo así al mantenimiento de los escasos ejemplares de la raza y a la difusión de su conocimiento entre las personas que asisten a dichas actividades (Barajas *et al.*, 2004).

Tabla 1. Evolución del nº de ejemplares de la raza ML (Sánchez, 1984; 2002).

Año	Nº de cabezas
1916	60.793
1955	15.600
1980	125
1988	60
1991	70
1997	36
2002	34
2009	36
2010	56



Figura 3. Vacas ML durante una romería en la actualidad.

El prototipo de la raza bovina ML está definido en el BORM N° 132, de 11 de junio de 2010, Decreto n° 129/2010, de 4 de junio, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba la reglamentación específica del Libro Genealógico de la raza bovina ML, donde se deben incluir animales con características definidas en esta norma.

2.4. Programa de mejora y conservación de la raza bovina ML

La situación genética en que se encuentra la raza ML hace que las instituciones oficiales la mantengan en situación de protección especial y que todos los ejemplares sean sometidos a un programa de conservación según lo estipulado en el RD 2129/2008, por el que se establece el Programa Nacional de Conservación, Mejora y Fomento de las Razas Ganaderas. Para esta raza, el programa es el que a continuación se resume, y se puede encontrar en extenso en la aplicación informática ARCA del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

El objetivo del programa es conservar y recuperar la raza bovina ML, dado que es un recurso genético animal insustituible. En su día, no tuvo competencia en las tareas y aptitudes que hicieron famosa esta vaca. Además, es un patrimonio genético ganadero que hemos de entregar a las generaciones futuras (Almela *et al.*, 2011; Poto *et al.*, 2011).

Como objetivos específicos, el programa dispone:

- Aumento del nº de ejemplares de raza pura que aún permanezcan, criándolos en las explotaciones de nacimiento y/o vendiéndolos a nuevos criadores con posibilidad de tener una explotación con registro oficial (conservación *in situ*).
- Mejora continua del Banco de Germoplasma con intercambio de material genético hacia las granjas de los criadores (conservación *in vitro*).
- Disminución de la consanguinidad con apareamientos intraraza e interrazas controlados.

Los criterios de conservación en la raza ML son los siguientes:

- Se criarán y conservarán *in situ* todos los ejemplares de la raza que se ajusten al prototipo racial y puedan ser incluidos en el Libro Genealógico.
- Se conservará el semen procedente de todos los toros que posean características raciales y que se tenga la certeza del porcentaje racial que presentan debido a sus ascendentes. Estimándose que, como mínimo habrán de tener el 75% de genes de la raza. Es decir, un/a abuelo/a de la raza, la madre con el 50% y el padre 100% de genes de la raza.
- Disminución de la consanguinidad mediante el cruce o IA de individuos lo más alejados posible, desde el punto de vista genético.
- Conservación de gametos de ambos sexos y embriones fecundados *in vitro*.
- Mantenimiento de un plantel de animales vivos de pura raza.
- Aumento del nº de ejemplares mediante la absorción de otras razas de características parecidas a la ML.

Dado que el censo es menor de 100 animales, las ganaderías colaboradoras serán todas las de Murcia y provincias limítrofes que en el momento de la puesta a punto del programa posean ejemplares con genes de esta raza.

2.4.1. Banco de Germoplasma

El banco de Germoplasma de la raza ML contiene actualmente 7280 dosis de semen perteneciente a 13 toros distintos, estando repartido en dos lugares diferentes y distantes, en concreto: el Departamento de Reproducción Animal (INIA, Madrid) y el IMIDA (Murcia), bajo la responsabilidad del Equipo de Mejora Genética Animal (Galián *et al.*, 2010). La eficacia reproductiva de estas dosis seminales es muy desigual, dependiendo de si la aplicación de las mismas se realiza en animales pocos o muy emparentados. Esta fertilidad se sitúa entre el 30% y el 50%, respectivamente, según se trate de animales de la

raza o de animales cruzados sometidos a retrocruce genético para aumentar las características raciales de la descendencia (Galián *et al.*, 2010).

En cuanto al nº de embriones conservados en banco de germoplasma, es muy escaso (170 embriones), limitándose a embriones obtenidos de ovocitos procedentes de ovarios de matadero (principalmente, razas Retinta y Limousin), sometidos a maduración y fecundación *in vitro* con semen del banco de germoplasma. Finalmente, el embrión obtenido *in vitro* se crioconserva (congelación o vitrificación) consiguiéndose una media de genes del 50% de los caracteres raciales en los embriones (Galián *et al.*, 2010; Poto *et al.*, 2012).

Debido al punto crítico en que se encuentran los escasos ejemplares de la raza, se hace necesaria la ampliación e incremento cualitativo y cuantitativo de los gametos, y aunque el nº de dosis almacenadas pudieran ser suficientes, existe un nº muy pequeño de toros donantes, lo que disminuye las posibilidades de almacenamiento de toda la variabilidad genética racial. También son insuficientes el nº de embriones en pureza racial en el banco de germoplasma y su posible aplicación en vacas receptoras. Tal es así, que se ha puesto a punto la técnica de recogida de ovocitos directamente de reproductoras vivas, técnica conocida como *Ovum Pick-Up* (OPU), donde la extracción directa de los ovocitos del ovario de las reproductoras durante varias semanas y sometidos a procesos de maduración *in vitro* (MIV), fecundación *in vitro* (FIV) y producción *in vitro* de embriones (PIV), mejora sustancialmente las posibilidades de recuperación racial (Ruiz *et al.*, 2013).

Este incremento de las dosis de gametos almacenados en N₂L (conservación *in vitro*) supone un incremento de los costes de conservación racial, cuestión que en la actualidad sería mal recibida por las autoridades presupuestarias. Sin embargo, la manipulación de las cerca de 7000 dosis seminales dirigidas al sexado de los gametos, podría reducir a la mitad los gastos de almacenamiento, dado que la aplicación de técnicas como la citometría de flujo, entre otras, nos permitiría conservar de cada toro solamente, aquellas dosis seminales que contengan el cromosoma X, y unas pocas con el cromosoma Y (Poto, 2012).

2.5. Conservación del semen bovino

2.5.1. Manejo de sementales bovinos

El manejo de los animales comienza muy temprano, con su ubicación en unas cómodas, amplias e higiénicas instalaciones que permitan a los animales el desarrollo armónico y la expresión de sus caracteres instintivos sexuales. La alimentación deberá constar de elementos proteicos y energéticos suficientes para la construcción orgánica y mantenimiento de la actividad vital. De igual modo, deberá estar equilibrada la composición vitamínico-mineral de la dieta, y con gran vigilancia de la composición en vitaminas liposolubles y minerales como el calcio, magnesio, fósforo y, principalmente zinc, entre otros. Las instalaciones deberán controlar también la temperatura ambiente, huyendo de la exposición al frío y calor extremos, así como de la humedad excesiva, situaciones contraproducentes para la producción espermática (Angelino, 2009).

Existen directivas europeas que impiden la utilización de sementales bovinos que padezcan enfermedades infecto-contagiosas como tuberculosis, brucelosis, leucosis bovina, perineumonía bovina, rinotraqueítis bovina infecciosa, diarrea vírica bovina, tricomoniasis y campilobacteriosis (Directiva 88/407/CEE).

No siempre pueden encontrarse sementales criados bajo normas de manejo adecuado, especialmente cuando la raza está en peligro de extinción. A veces se encuentran animales que no han expresado totalmente sus aptitudes debido a las instalaciones, alimentación y manejo sanitario inadecuados. Ante la rapidez con la que es necesario actuar, estos animales también son elegidos como reproductores a pesar de que los resultados finales no son los que se esperan para un semental perfectamente manejado, quedando a la espera del desarrollo de los hijos del ejemplar en cuestión, si es que da tiempo para ello. Esto redundará en la baja fertilidad obtenida en la aplicación de las diferentes técnicas reproductivas, complicándose a su vez con

la alta consanguinidad que suelen presentar los animales en peligro de extinción (Poto, 2012).

2.5.2. Sistemas de recogida de semen

Dentro de un programa de criopreservación e IA, la obtención de muestras seminales es el primero de los pasos. Esta primera fase es fundamental para la obtención de muestras de calidad óptima, así como para la adecuada utilización de los sementales. La obtención de semen mediante el empleo de una vagina artificial es el método más común en la mayoría de las especies domesticas. Sin embargo, la aplicación de este método requiere entrenamiento (Angelino, 2009).

Otro método utilizado para la extracción del semen de toro es la electroeyaculación, sistema que consiste en la aplicación de una serie de estímulos eléctricos, mediante el empleo de uno o más electrodos, variando la secuencia, el nº y la magnitud del estímulo. La electroeyaculación se basa en la estimulación de las vías nerviosas involucradas en el reflejo eyaculatorio o de los nervios motores que inervan las glándulas genitales accesorias y la uretra (Poto, 2012).

2.5.2.1. Vagina artificial

La vagina artificial (VA) intenta simular las condiciones del aparato genital femenino en situación de estro. Antes de recolectar el semen se deben tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y el estímulo del semental (Poto *et al.*, 2006b).

El método más práctico para estimular al toro es la llamada “monta falsa”, y consiste en dejar que el semental realice la monta sobre el señuelo de forma que se desvíe el pene retirando con la palma de la mano la piel del prepucio sin introducir el pene en la VA. Tras algunos segundos de intento de búsqueda de la vagina sin éxito, el animal desciende. Es en el siguiente intento de monta cuando se desvíe el pene hacia la entrada de la VA, lo que deriva en

que rápidamente el toro realiza un “golpe de riñón”. La monta falsa en el bovino aumenta la calidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y motilidad (Poto *et al.*, 2006a).

2.5.2.2. Electroeyaculación

Los electroeyaculadores actúan estimulando los nervios pélvicos simpáticos y parasimpáticos mediante impulsos de bajo voltaje y amperaje; lo que produce la erección penénea y por tanto, la eyaculación. La sonda rectal del electroeyaculador se lubrica y es introducida por el ano en la región rectal hasta ocupar la cavidad pélvica. La eyaculación se consigue gracias al estímulo de los nervios simpáticos lumbares (hipogástrico) en la parte más anterior de la cavidad pélvica. Los nervios sacros que causan erección y eyaculación están localizados en la parte posterior. El estímulo producido ha de ser intermitente, constante, y su intensidad deberá aumentarse gradualmente hasta que se produzca la eyaculación. El semen será recolectado colocando el embudo con el tubo colector en la punta del glande del pene (Poto *et al.*, 2006a).

2.5.2.3. Lavado del epidídimo y vías deferentes

El lavado del epidídimo y las vías deferentes es un método de recuperación de espermatozoides alternativo que permite obtener descendientes mediante IA o FIV, de toros genéticamente valiosos que hayan muerto de forma inesperada. Por tanto, podríamos decir que la recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo es otro método para perpetuar la calidad genética de toros postmortem, dado que los espermatozoides que allí se encuentran tienen capacidad fecundante (Reyes Moreno *et al.*, 2000; 2002).

Los espermatozoides epididimarios se recolectarán según los siguientes protocolos: recolección mediante lavado epididimario, desmenuzamiento del epidídimo y el método mixto que involucra los dos protocolos anteriores. En definitiva estos métodos consisten en el lavado de los espermatozoides que quedan en el tubo epididimario con la ayuda de un líquido adecuado a las características físico-químicas del fluido a extraer. En el primer y último de los

casos se hace pasar el líquido de lavado a presión por el interior del tubo, mientras que en el segundo se realiza el corte y desmenuzamiento de todo el tubo epididimario diseccionado, lavándolo a continuación (Matás *et al.*, 2010).

2.5.3. Valoración del eyaculado bovino

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino. De una cuidadosa valoración de la fertilidad dependerá la utilización futura del material seminal y el grado de aprovechamiento de los eyaculados obtenidos a lo largo de su vida reproductiva. Es decir, las dosis producidas por eyaculado están en función del nº de espermatozoides viables y, en definitiva, de su mayor o menor rentabilidad.

Muchos investigadores en el área de la reproducción animal están tratando de diseñar el “*análisis seminal ideal*”, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal. El análisis de semen ideal sería aquel que de forma sencilla y eficaz permitiera predecir la capacidad fecundante de un eyaculado concreto. Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Hidalgo *et al.*, 2005). Cabe destacar que hasta el momento no se ha conseguido un método de evaluación seminal *in vitro*, que al utilizarlo solo o en combinación con otros sea capaz de predecir de forma segura la capacidad fecundante de una muestra de semen. Por ello, para considerar a un toro como apto desde el punto de vista reproductivo, asumiendo que es un animal clínicamente sano, este debe cumplir con tres requisitos básicos: buena libido, buen estado clínico reproductivo y buena calidad espermática. La evaluación del semen es un elemento importante para la certificación de la aptitud reproductiva en un toro (García, 2013).

2.5.3.1. Valoración macroscópica: color, olor y volumen

La evaluación macroscópica del semen debe incluir los parámetros siguientes: color, olor y volumen (Morillo *et al.*, 2012).

- *Color*: generalmente, el semen bovino es de color blanco. Las muestras más densas serán de color y aspecto más cremoso, mientras que las más diluidas serán de aspecto lechoso y hasta completamente claro y transparente, como es el caso de aquellos animales con oligospermia o azoospermia. En la **tabla 2** se muestra la relación entre el color del semen recolectado y su concentración (esp/ml). En algunos toros se pueden observar eyaculados de color amarillento; esto se corresponde con un pigmento llamado riboflavina que se produce en las glándulas seminales y que es inocuo. También se puede observar una coloración rojiza, la cual indica la presencia de sangre fresca, mientras que un color pardo señala la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica suciedad. Los eyaculados con muy pocos espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa. Circunstantialmente puede aparecer en el semen flóculos de pus, indicio de una infección en los genitales masculinos.

Tabla 2. Relación entre el color del semen recolectado y su concentración (esp/ml) (Rosemberger, 1981).

Color	Concentración espermática (esp/ml)
Blanco cremoso	≥ 1000000
Blanco lechoso	800000 - 600000
Blanco acuoso	< 50000

- *Olor*: las muestras de semen recogidas higiénicamente de toros sanos y fértiles tienen un olor catalogado como *sui generis*, es decir, un débil olor aromático como a yema de huevo. Son motivo de rechazo un olor urinoso o

pútrido, que se produce tras una contaminación de la muestra con materia fecal, por ejemplo.

- *Volumen*: Se ha señalado, basado en experiencias con VA, que el eyaculado de un toro joven tiene en promedio un volumen mayor a 2 ml, mientras que un toro adulto tiene un volumen mayor a 4 ml. Las pruebas con electroeyaculador indican valores normales volúmenes superiores a 5-7 ml.

La concentración espermática varía en función de la especie, edad, raza, estado fisiológico del individuo, método de recolección, estado nutricional, frecuencia de la recolección, excitación sexual, época del año y peso vivo del animal y con el volumen total del semen recolectado.

Cuando se obtiene un segundo eyaculado a los 15-20 min después del primero, puede llegar a ser más voluminoso, pero esta diferencia podría no existir en el caso de una muy buena excitación antes de la primera recolección. En general, los animales bovinos de razas lecheras dan un eyaculado de mayor volumen que aquellos de raza carnífera (Muiño *et al.*, 2006a,b).

También es sabido que con el uso de la electroeyaculación, el volumen y la densidad del eyaculado sufren variaciones, que no han de ser consideradas como alteraciones en la producción de semen del animal (Vera, 2011).

2.5.3.2. pH

El test de pH, generalmente, se incluye en los análisis de rutina como un parámetro orientador. El pH viene dado por el resultado de las secreciones ácidas provenientes de la próstata y las secreciones alcalinas de las vesículas seminales (Morillo *et al.*, 2012). El líquido seminal tiene un pH alcalino, oscilando entre 7.2 y 8. El pH en el semen del toro oscila entre 6.6 y 6.9 hasta 7 como valor normal. Si el pH excede de 8 se puede sospechar de algún tipo de infección y probablemente, en ese caso, disminuya la secreción de productos ácidos de la próstata, como el ácido cítrico. Se pueden registrar también valores de pH anormales en el caso de eyaculación incompleta. Valores de pH

extremadamente ácidos (<6'5) se encuentran en casos de agénesis u oclusión de las glándulas vesiculares. La determinación del pH debe hacerse relativamente pronto porque se va alcalinizando con el tiempo.

2.5.3.3. Índices bioquímicos

Los estudios bioquímicos del semen se desarrollaron con el fin de medir de forma objetiva la calidad del semen, pero tienen como limitación los requisitos de tiempo, instrumentación y de personal especializado que los hacen costosos. Aún cuando estos ensayos son una medida más objetiva de la muestra seminal, las correlaciones con la fertilidad obtenidas hasta el momento no han sido muy consistentes (Graham *et al.*, 1980; Jeyendran *et al.*, 1989), por lo que la utilización de estas técnicas ha quedado relegada a los estudios experimentales.

Se han estudiado los procesos metabólicos del semen, realizando análisis enzimáticos y cuantificando los constituyentes químicos del semen y del plasma seminal (Gadea, 1997). Pero todos estos estudios son poco eficaces en cuanto a lo oneroso de su ejecución y la poca información que proporcionan.

2.5.3.4. Concentración espermática

Existe una variabilidad muy grande en la concentración de un eyaculado a otro, y de un toro a otro, siendo importante conocer el nº de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el nº de dosis seminales que se obtendrán. Así, Hafez y Hafez (2000) aportan datos de concentración de 2×10^8 esp/ml en toros jóvenes y $1'8 \times 10^9$ esp/ml en adultos. Herrick y Self (1965) mencionan que toros de alta fertilidad deben de tener concentraciones entre $0'8$ y 2×10^9 esp/ml; Orji *et al.* (1984) ofrecen medias de $2'16 \times 10^9$ esp/ml; Marín (1994) de $0'3-2 \times 10^9$ esp/ml y Hunter (1987) de $1'2-1'8 \times 10^9$ esp/ml. Existen diferentes métodos para determinar la concentración espermática en el semen. Una forma puede ser la utilización de hemocitómetros (Neubauer, Thomas-Zeib y Bürker-Turk) (Vallecillo, 2011). Éstas se basan en realizar una dilución (1:100;

1:200) de la muestra de semen con solución salina formolada, para finalmente observarse en un microscopio óptico (40 X). Otro procedimiento técnico para determinar la concentración espermática es mediante fotometría. Encontramos equipos que miden la concentración del semen puro (*Spermacue®*, *Minitübe*, Alemania) a partir de una gota (5 µl), así como los que miden la muestra por opacidad (*Accucell®*, *IMV*, Francia). La valoración de la opacidad mostrada por una muestra de semen requiere la dilución en solución salina formolada o suero fisiológico (Contri *et al.*, 2010).

La posibilidad de estudiar adecuadamente la concentración espermática es un factor importante, tanto en el ámbito de la investigación andrológica como en la aplicación en el campo de la IA. Las técnicas más utilizadas son el recuento en cámaras hemocitométricas y la utilización de espectrofotómetros, ya que los contadores de partículas, los métodos fluorométricos y los sistemas de análisis de semen asistidos por ordenador son más complejos y lentos. El primero de ellos es el más utilizado por su bajo coste y su alta precisión, ya que se realiza una medición directa del nº de espermatozoides presentes en una cámara de volumen conocido. Aún siendo el método más preciso, presenta elevados coeficientes de variación ($\pm 10\%$) entre replicados (Pace, 1980). Estas variaciones son debidas a distribuciones no homogéneas de las células dentro de la cámara y a imprecisiones en el proceso de dilución (Woelders, 1991). El método espectrofotométrico es un derivado del anterior, mediante la correlación entre concentraciones y unidades de transmitancia. Es un método rápido y de fácil uso que se ha extendido en gran medida en los grandes centros de IA (CIA) porcina, donde se procesa un gran nº de muestras seminales.

El contador de partículas y las técnicas de análisis automatizados de imagen permiten medir muy rápidamente un gran nº de partículas por unidad de volumen. Por otra parte, es necesario calibrar adecuadamente el instrumental para asegurar que el recuento de partículas sea correcto (Graham *et al.*, 1980). Otra técnica que se encuentra en desarrollo, es la medición por técnicas fluorométricas del nº de células por cuantificación de la cantidad de ADN. Es un método sencillo si se dispone del instrumental adecuado, ya que el ADN teñido específicamente con un fluorocromo (H33258) puede ser medido

con gran precisión porque la cantidad de ADN presente en un espermatozoide es un valor constante (Woelders, 1991).

2.5.3.5. Motilidad espermática

Este parámetro ha sido el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal, al ser ésta una de las más importantes expresiones de la función espermática, que según algunos autores, puede ser uno de los factores que mejor se correlaciona con la fertilidad (Muiño *et al.*, 2005). El movimiento activo de los espermatozoides es imprescindible para la colonización del oviducto durante la fase de transporte espermático sostenido en el tracto genital de la hembra, y para que tenga lugar la fecundación. Además, la motilidad es una manifestación de vitalidad espermática y de integridad celular. Un eyaculado con un porcentaje bajo de espermatozoides móviles, o ausencia de motilidad, automáticamente será descartado para el procesamiento posterior (Holt y Van Look, 2004). La motilidad espermática, normalmente se valora de forma subjetiva mediante la observación de una muestra de semen con microscopio óptico sobre platina calentadora a 37°C.

2.5.3.5.1. Motilidad masal

En el eyaculado de los rumiantes, dada su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal, definida como el movimiento en remolinos del total de espermatozoides de la muestra. La valoración de la onda de movimiento es el sistema más simple para determinar la motilidad del semen fresco (Vallecillo, 2011). La motilidad masal, únicamente evaluable en eyaculaciones de mamíferos con concentraciones espermáticas muy elevadas como en el toro, se determina depositando una gota de la muestra seminal sin diluir sobre un porta-objetos atemperado en una placa térmica, y visualizando sobre la muestra en un microscopio óptico a 10 X. Se evalúa de forma subjetiva el movimiento de las células espermáticas en su conjunto, y se les da una valoración de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimiento rápido y vigoroso, y de 0 cuando no se observan movimientos en ondas (Evans y Maxwell, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

2.5.3.5.2. Motilidad progresiva o individual

La motilidad progresiva es uno de los parámetros más importantes de un análisis seminal (Hidalgo *et al.*, 2005). Este parámetro es el más utilizado para valorar la calidad de un eyaculado o de una dosis seminal (Muiño, 2008). Tras la dilución del eyaculado, o la descongelación de dosis de semen congelado, se estima el porcentaje de espermatozoides individuales que están en movimiento y el tipo de movimiento que realizan (progresivo o no progresivo). Las dosis descongeladas con una motilidad progresiva inferior al 40% (Saacke, 1972) se descartan para IA. La motilidad individual puede evaluarse de forma subjetiva o mediante un sistema de imágenes asistido por ordenador.

Metodología convencional subjetiva

El método tradicional para determinar la motilidad progresiva consiste en utilizar una gota de semen que se deposita entre un porta y un cubreobjetos para evaluar el movimiento de los espermatozoides, generando así una película fina que permita determinar, de forma más o menos precisa, el porcentaje de células móviles presentes en la muestra, e incluso realizar una valoración de si el tipo de movimiento observado es normal o no. Se observan varios campos por muestra utilizando para ello un microscopio óptico a 100 ó 200 X. La estimación de dicho parámetro está dada en una escala de 0 a 100. También es frecuente encontrar medidas subjetivas de motilidad individual con otra escala de valoración, siendo estimada, al igual que la motilidad masal, en una escala de 0 a 5, siendo cero la ausencia de movimiento y 5 el máximo movimiento progresivo observado. El resto de los valores se reparten entre diversos tipos de movimiento espermático progresivo. El límite de aceptación de un eyaculado está por debajo de 3.

La motilidad puede verse alterada tanto por una inadecuada temperatura como por la presencia de sustancias tóxicas en el equipo de recolección (Álamo-Santana, 2007).

La valoración visual de la motilidad espermática es el método más simple, rápido y barato. Sin embargo, es altamente subjetivo puesto que los resultados obtenidos dependen en gran parte de la habilidad y experiencia del técnico que evalúa la muestra (Rodríguez-Martínez, 2000; Phillips *et al.*, 2004); y además, si se trabaja con muestras muy concentradas se tiende a sobreestimar el porcentaje de espermatozoides móviles. Por tanto, no es un método que, de forma fiable y repetible, permita predecir la capacidad fecundante de una muestra de semen (Linford *et al.*, 1976).

Estudio asistido por ordenador (CASA)

El análisis computerizado de la motilidad fue propuesto por primera vez por Dott y Foster (1979). Desde que se introdujeron en el mercado a principios de los años 80, originalmente para la evaluación del semen humano, éstos se han ido perfeccionando y modernizando, a la vez que fueron haciéndose más accesibles; y por consiguiente, comenzaron a utilizarse en el campo de la ciencia animal (especialmente en especie bovina), tanto en CIAs como centros de investigación.

Estos sistemas se basan en la captura sucesiva de imágenes de espermatozoides en movimiento provenientes de un microscopio (50 imágenes/seg). Estas imágenes se digitalizan identificando las células espermáticas que contiene la primera imagen. Luego se procede al seguimiento de las células en imágenes sucesivas y al establecimiento de las trayectorias definitivas. El parámetro determinado para cada espermatozoide es la velocidad del movimiento en base a varios descriptores (Boyers *et al.*, 1989). Con esas trayectorias se calculan, tradicionalmente, una serie de parámetros, donde la línea roja marca la trayectoria correspondiente a VCL (velocidad curvilínea), la línea azul se refiere a la VSL (velocidad lineal) y la trayectoria verde corresponde a la VAP (velocidad media). El análisis se hace al capturar las imágenes de espermatozoides en movimiento, previamente diluidos en un medio adecuado y en el microscopio a 100 ó 200 X (Quintero-Moreno y Rubio, 2008).

2.5.3.6. Vitalidad espermática

El término vitalidad espermática es generalmente utilizado, para referirse a los espermatozoides con membrana plasmática intacta. Es un factor importante en la evaluación de la calidad del semen, ya que una membrana plasmática intacta es necesaria para mantener las actividades metabólicas intracelulares, e interactuar con la zona pelúcida y plasmalema de un ovocito para una fertilización exitosa (Bradley, 1999). La rotura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de vitalidad celular, sin embargo, una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable. Los procedimientos más habitualmente utilizados para la valoración de la vitalidad son las técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales; por lo tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si esta alterada, el colorante penetra en el interior de la célula y aparece teñida (Bajo y Coroleu, 2009).

2.5.3.6.1. Tinción vital

El método más tradicionalmente utilizado es la tinción con eosina-nigrosina (E-N) (Tartaglione y Ritta, 2004), que también se utiliza para la valoración de morfoanomalías; pero algunos autores describen el uso de otras tinciones como el verde rápido/eosina, eosina/azul de anilina, tripán azul/giemsa o amarillo de naftol/eritrosina. También se usan tinciones comerciales como por ej. “Spermac[®]” (Minitübe, Alemania). La evaluación morfológica de la integridad de la membrana plasmática se realiza usando el microscopio óptico de contraste de fases (1000 X, contabilizando 200 células), o la óptica de contraste diferencial de interferencia o Nomarski (Bradley, 1999; Hidalgo-Ordóñez *et al.*, 2005; Álamo-Santana, 2007). El procedimiento muestra una extensión donde aparecen células vivas de color blanco sobre un fondo púrpura, o teñidas de rosa si están muertas (Iguer-Ouada y Verstegen, 2001). Para medir la vitalidad de una muestra de semen en análisis de rutina, se utilizan colorantes vitales, tales como la combinación E-N, con la que los

espermatozoides muertos se teñirán de color rojo o rosa, mientras que los vivos quedarán sin teñir (Quintero-Moreno *et al.*, 2009).

2.5.3.6.2. Tests de resistencia

Por otra parte, se han desarrollado métodos alternativos para evaluar la integridad de la membrana espermática:

1. *Test de endósmosis o hipoosmótico (HOST)*: Es un método simple para cuantificar la proporción de espermatozoides con una membrana plasmática funcionalmente intacta. La prueba consiste en situar los espermatozoides en presencia de un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo. Por tanto, la exposición del espermatozoide a un medio hipoosmótico supone una entrada de agua a través de la membrana espermática que da lugar a un aumento del volumen celular (Devrius y Ericsson, 1966).

Éste lleva asociado una expansión esférica de la membrana que cubre la cola, lo que hace que el flagelo se enrolle, y provoque un cambio morfológico muy evidente cuando se observa bajo microscopio óptico de contraste de fases (Chan *et al.*, 1985). El enrollamiento de la cola comienza en la zona distal y progresa hacia la porción intermedia y la cabeza del espermatozoide (Devrius y Ericsson, 1966; Jeyendran *et al.*, 1984). Los medios hipoosmóticos utilizados deben producir una diferencia osmótica suficiente para inducir un enrollamiento de la cola que pueda ser observado y no excesivamente elevada para no provocar lisis de la membrana espermática (Jeyendran *et al.*, 1984). Los valores obtenidos en esta prueba se correlacionan con otros parámetros de calidad seminal, como motilidad, vitalidad o morfología (Hidalgo *et al.*, 2005).

2. *Test de resistencia osmótica (ORT)*: Fue desarrollado a partir de los trabajos de Schilling *et al.* (1984), como una prueba para determinar la diferente capacidad de conservación del semen porcino a las temperaturas de refrigeración. Esta técnica está basada en la determinación de la resistencia de las membranas acrosomales ante la incubación en condiciones hipoosmóticas, generalmente se utiliza en ganado porcino.

3. *Test de resistencia hiperosmótica (HRT)* (Rubio-Guillén y Quintero-Moreno, 2008): Cuando los espermatozoides son criopreservados se exponen a condiciones hiperosmóticas del medio congelado afectándose la integridad de la membrana plasmática y la motilidad del semen. Cualquier alteración en las membranas del espermatozoide ha sido asociada con la pérdida de la vitalidad espermática, por lo que resulta de suma importancia evaluar la resistencia de la membrana acrosomal del espermatozoide a un cambio brusco de la osmolaridad, incubando muestras seminales desde una solución hiperosmótica hasta una isosmótica y observando el porcentaje de acrosomas normales (NAR) al utilizar la tinción doble azul Trypan-Giemsa o la tinción eosina-nigrosina. Cuantas más reacciones acrosómicas o pérdidas completas del acrosoma tienen lugar después de incubar el semen, menor es la resistencia de la muestra seminal al cambio osmótico, y por ende, podría presentar menor congelabilidad y capacidad fecundante a nivel de campo.

2.5.3.6.3. *Estudio de vitalidad espermática mediante fluorocromos*

Se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides mediante el uso de dos fluorocromos combinados; uno de ellos sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas, y por tanto permite identificar la población de células viables (Garner, 1997).

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el yoduro de propidio (IP). Este compuesto entra en los espermatozoides con

la membrana plasmática dañada, se une al núcleo, y al ser excitado por una longitud de onda apropiada (510-560 nm), emite fluorescencia roja. Además del IP, existen otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas cuyo mecanismo de acción es similar, como por ejemplo, el Hoeschst 33258 (Pintado *et al.*, 2000), bromuro de etidio (Evenson *et al.*, 1982) o la hidroetidina (HED) (Ericson *et al.*, 1989), entre otros.

Entre los fluorocromos más utilizados para identificar la población de células vivas se encuentra el grupo de las carboxifluoresceínas: CFDA (diacetato de carboxifluoresceína) (Garner *et al.*, 1988), CMFDA (diacetato de carboximetilfluoresceína) (Garner *et al.*, 1986) o CDMFDA (diacetato de carboxidimetilfluoresceína) (Ericson *et al.*, 1990), compuestos fluorescentes capaces de atravesar membranas celulares intactas.

Otro fluorocromo ampliamente utilizado para identificar espermatozoides vivos es el SYBR-14, capaz de atravesar membranas intactas y de unirse al ADN de los espermatozoides (Garner *et al.*, 1988; Garner y Johnson, 1995). Presenta algunas ventajas con respecto a los fluorocromos basados en la actividad esterasa intracelular: es una molécula más estable, no ha de sufrir transformación enzimática para poder actuar, y se une específicamente al ADN del espermatozoide, lo que supone que toda partícula que no contenga dicho material genético no se va a marcar, y por tanto quedará descartada del análisis. El SYBR-14 suele utilizarse en combinación con IP (Garner *et al.*, 1988), y de esta forma se pueden distinguir dos poblaciones espermáticas: una de ellas constituida por células muertas o en estado de degeneración, cuyas membranas plasmáticas son permeables al IP, y por tanto emiten fluorescencia roja; y la otra constituida por espermatozoides viables, cuyas membranas intactas son impermeables al IP pero dejan entrar al SYBR-14, y por tanto emiten fluorescencia verde.

Un fluorocromo con un mecanismo de acción similar al del SYBR-14, capaz de identificar espermatozoides vivos, es el Hoechst 33342. Este compuesto también penetra en células vivas y se une al ADN espermático, sin embargo, su uso está limitado por la longitud de onda de su espectro de

excitación, que está en el rango UV. La mayoría de los citómetros disponen de un láser con una longitud de onda de 488 nm, y para evaluar las muestras marcadas con Hoechst 33342, es preciso disponer de un láser de menor longitud de onda.

2.5.3.7. Estudio del acrosoma

Los enzimas que contiene el acrosoma tienen un papel fundamental en el proceso de penetración del ovocito, de manera que la presencia de anomalías morfológicas de esta región está asociada a una reducción de la fertilidad (Hashizume *et al.*, 1990). Las alteraciones de la morfología del acrosoma son debidas a procesos fisiológicos asociados, por un lado al envejecimiento de la célula espermática, y por otro, al proceso de fecundación (Yanagimachi, 1994). No obstante, también se producen cambios en el acrosoma como consecuencia de shock por frío, en procesos de congelación-descongelación, en cambios de presión osmótica, por diluciones y centrifugaciones repetidas (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

La evaluación rutinaria del estado del acrosoma en el ganado permite eliminar eyaculados que presentan baja calidad, para lo que se han utilizado diversos métodos. Las muestras pueden ser fijadas al aire y teñidas con tinciones simples con Giemsa (Niwa *et al.*, 1981); tinciones dobles como Tripán Azul y Giemsa (Didion *et al.*, 1989), rojo Congo y Tripán Azul (Kovacs y Foote, 1992) o bien con una triple tinción (TST) (Vázquez *et al.*, 1992). Las muestras también pueden ser observadas en microscopía de contraste de fases después de la fijación en glutaraldehído (Pursel y Johnson, 1974), mientras que otras técnicas más laboriosas incluyen la utilización de anticuerpos y lectinas marcadas con fluorocromos (Berger, 1990), o bien técnicas de microscopía electrónica de transmisión (Hashizume *et al.*, 1990). En la literatura se describen defectos específicos del acrosoma, como los denominados "*knobbed*", que están relacionados con machos estériles o subfértiles (Toyama e Itoh, 1993).

La relación del estado del acrosoma con la fertilidad es poco importante para algunos autores (Pursel *et al.*, 1984, test heterospérmico); sin embargo, otros sí encuentran correlaciones positivas entre el nº de acrosomas normales y la fertilidad (Galli y Bosisio, 1988), o también una relación negativa entre el porcentaje de acrosomas alterados y el índice de fertilidad en un ensayo heterospérmico (Berger y Parker, 1989).

2.5.3.8. Estudio de la cromatina

El estudio de la cabeza espermática, que aporta el material genético en forma de cromatina (ADN asociado a protaminas), ya sea mediante la evaluación de su forma a través de diferentes tinciones, o de medidas morfométricas, o a través de sistemas computerizados de análisis seminal, tiene gran interés, dado que, tanto las alteraciones en la forma de las medidas morfométricas, como de la integridad de la cromatina, han sido relacionadas con el potencial reproductivo de los toros. Los espermatozoides con alteraciones morfológicas de la cabeza no participan del proceso de fecundación, mientras que los espermatozoides con cromatina dañada, si bien no pierden la capacidad fecundante, no son capaces de promover un desarrollo embrionario normal. La cabeza del espermatozoide tiene una longitud de entre 8 y 10 μm y un ancho de 4 a 5 μm y las variaciones en estas mediciones y/o los productos de sus combinaciones (área, perímetro, elipticidad) podrían ser un indicador de cromatina dañada, ya que la cabeza del espermatozoide está compuesta básicamente por cromatina (Nava-Trujillo *et al.*, 2013).

El núcleo espermático de mamíferos tiene una alta estabilidad como consecuencia de la organización particular de su cromatina. La maduración y compactación de esta última se completa en el epidídimo, a través de importantes cambios estructurales y bioquímicos, que incluyen el reemplazo de histonas por protaminas y la formación de un gran nº de puentes disulfuro, intra e intermoleculares entre los residuos de cisteína de las moléculas proteicas. La presencia de puentes disulfuro entre cromátidas vecinas, y dentro de una misma cromátida, lleva a la formación de una estructura casi cristalina (Spano *et al.*, 1999).

La calidad de la cromatina espermática es crítica, ya que los espermatozoides con anomalías cuantitativas y/o cualitativas en la cromatina, si bien pueden, en algunos casos, llegar a fertilizar un ovocito y producir embriones, éstos últimos difícilmente tendrán éxito en completar la preñez y originar individuos sanos (Evenson *et al.*, 2002).

En la especie humana se ha descrito una relación entre la alteración de la estructura de la cromatina y la infertilidad (Evenson *et al.*, 1980), así como en el ganado vacuno se han encontrado correlaciones significativas entre la evaluación de la estructura cromosómica y la fertilidad medida en una prueba de campo ($r=-0'58$; Ballachey *et al.*, 1987) y medida en un ensayo heterospérmico ($r=-0'94$; Ballachey *et al.*, 1988).

- *Naranja de Acridina*: Para estudiar el ADN se han utilizado técnicas fluorescentes como la tinción con “Naranja de acridina” (Kosower *et al.*, 1992). Este fluorocromo se intercala entre la doble hélice del ADN como un monómero, mientras que la unión con las cadenas simples de ADN la hace en forma de agregado. Esta diferencia se visualiza en forma de una emisión verde en el caso de ADN en doble cadena que se corresponde con una situación normal, mientras que en el caso de la cadena única de ADN se visualiza una emisión roja. Los eyaculados de un macho fértil cuentan con un mayor nº de espermatozoides que presentan coloración verde después de un proceso que induce la desnaturalización, ya sea por calor (Evenson *et al.*, 1980) o por un tratamiento con ácido y alcohol que al mismo tiempo fija y desnaturaliza la muestra (Tejada *et al.*, 1984).

- *Azul de toluidina*: Se trata es un colorante nuclear que genera reacciones metacromáticas cuando se asocia a la cromatina. Cuando el colorante se incorpora en la cromatina rica en histonas (con abundancia en lisina), presenta una alta coloración violeta-azulada, mientras que cuando lo hace a una cromatina rica en protaminas presenta una coloración azul-pálida. Es una prueba de maduración-condensación nuclear donde los espermatozoides con cromatina inmadura tendrán más roturas del ADN. Se ha

utilizado para evaluar la integridad de la cromatina en semen de diferentes especies, incluyendo el semen de toro (Beletti *et al.*, 2005).

- *Otras técnicas:* La integridad de la cromatina también puede ser evaluada mediante otras técnicas entre las que destacamos las siguientes: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling* (Efecto TUNEL), *In Situ Nick Translation* (INST), *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), *DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization* (DBD-FISH), Ensayo Cometa, *Sperm Chromatin Dispersion* (SCD) y electroforesis de proteínas básicas (Evenson *et al.*, 2002).

Muchas de las técnicas antes referidas son laboriosas y requieren equipos sofisticados y costos elevados que hacen que tengan un uso limitado en la práctica veterinaria, lo que restringe la adopción de forma rutinaria de esta evaluación en los laboratorios (Beletti y Melo, 2004). De aquí la importancia del estudio de técnicas que permitan la evaluación de la cromatina espermática de forma económica, sencilla y fiable.

2.5.3.9. Estudio de morfoanomalías

Para una interacción normal del espermatozoide con el microambiente del tracto genital femenino y con las envolturas del ovocito, además de tener motilidad progresiva, los espermatozoides han de ser morfológicamente normales. Cualquier anomalía que afecte a algún atributo del espermatozoide puede dificultar su migración en el tracto genital de la hembra, impidiendo la unión con el ovocito (Rodríguez-Martínez, 1999). Cuanto mayor sea la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, menor será la capacidad fecundante del mismo (Howard y Pace, 1998). Por tanto, se ha de tener muy presente que las muestras de semen con un porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales inferior al 70% han de descartarse para la congelación (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

Las anomalías espermáticas se clasifican atendiendo a distintos criterios dependiendo de: a) si se originan en el testículo (anomalías mayores) o a lo

largo del tránsito epididimal o tras la eyaculación (anomalías menores); *b*) si están asociadas a infertilidad o no (primarias o secundarias, respectivamente); *c*) la región espermática implicada (anomalías de la cabeza, de la pieza intermedia o de la pieza principal). Cualquier anomalía, primaria o secundaria, si afecta a un nº elevado de espermatozoides, puede influir en la fertilidad del semen (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

Anomalías más frecuentes en semen bovino, como las colas enrolladas o los plegamientos de la zona intermedia, si se encuentran en grandes cantidades en el eyaculado, pueden mermar la fertilidad del toro, ya que los espermatozoides defectuosos no poseen una motilidad normal, y por tanto, no van a poder alcanzar al ovocito (Nothling y Arndt, 1995). Se desconoce cual es el porcentaje máximo de morfoanomalías espermáticas compatible con una fertilidad normal, pero está demostrado que existe una correlación negativa entre el nº de formas anormales y la fertilidad del semental (Januskauskas y Zilinskas, 2002).

2.5.4. Criopreservación de semen bovino

Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector (CP) efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de varias especies se congela y utiliza con éxito en la IA. Sin embargo, y con excepción de los bóvidos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a otras especies domésticas (Holt, 2000).

La reducción de la temperatura por debajo de los 37°C y, principalmente, de 20°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann y Pickett, 1987). El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del N₂L, sino mantener la vitalidad en un rango de temperatura, entre -15°C y -60°C, en el que se producen los mayores daños, y que las células experimentan en dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que por debajo de -130°C no existe agua en estado líquido (Mazur, 1984a,b).

Para las células espermáticas, la tasa óptima de descenso de la temperatura oscila entre 10 y $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$, ya que velocidades superiores o inferiores provocan una disminución de la supervivencia (Rodríguez *et al.*, 1975). Cuando una suspensión de células se enfría a menos de 0°C , se forman cristales de hielo extracelulares, lo que hace que los solutos se concentren en el agua líquida restante. La membrana celular actúa como una barrera que impide la diseminación de los cristales de hielo hacia el interior de los compartimentos intracelulares (Watson, 1979). Las sales no forman parte de los cristales de hielo, de modo que aumenta la concentración de sales en la porción remanente del agua no-congelada. El aumento del gradiente osmótico a través de la membrana plasmática provoca la difusión del agua intracelular hacia el ambiente extracelular, causando deshidratación de la célula y de la membrana plasmática (Amann y Pickett, 1987).

Si se agregan CPs como el glicerol o el dimetil-sulfóxido (DMSO) al medio de congelación, es posible retardar la deshidratación celular y el consecuente daño por el efecto de la disolución (Hafez y Hafez, 2000). Por tanto, la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones ultraestructurales de la membrana, y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992).

Las células congeladas están sujetas a tensiones que resultan de las interacciones agua-soluto y que aumentan con la cristalización del agua. Durante la congelación, la exposición de células al medio hiperosmótico descongelado provoca la salida de agua intracelular, causando el encogimiento de la célula y la posible entrada de iones. La descongelación involucra una inversión de estos efectos, y el flujo de agua al interior de la célula puede causar la rotura de la membrana de la célula (Holt, 2000). Existe una velocidad de enfriamiento óptima para cada tipo de célula, dependiendo de su tamaño, relación superficie-volumen, permeabilidad al agua y el coeficiente de temperatura de esa permeabilidad (Medina-Robles *et al.*, 2007). La congelación lenta permite una deshidratación celular progresiva que provoca un aumento de

la concentración intracelular de solutos, impidiendo así la formación de cristales intracelulares. A medida que el medio extracelular se va congelando, las células quedan atrapadas en canales de solución sin congelar, siendo los niveles de supervivencia espermática muy altos si permanece sin congelar alrededor del 15% del agua extracelular (Amann y Pickett, 1987).

En la congelación rápida, no hay tiempo suficiente para que se produzca el paso del agua intracelular al medio extracelular y por tanto, la deshidratación. El agua que queda en el interior de la célula se congela formando cristales que causan daños mecánicos graves. Por otro lado, la descongelación lenta impide la formación de grandes cristales de hielo, pero provoca mayores daños por efecto de la disolución. De este modo, la rapidez de descongelación óptima para un tejido dado depende de su tolerancia relativa al daño por cristales de hielo y a la toxicidad por efecto de la disolución (Hafez y Hafez, 2000).

Por tanto, es importante que alcanzar una longevidad celular máxima, requiera que el ritmo de descongelación esté en proporción con el ritmo apropiado de congelación (Mazur, 1984a,b).

El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del CP, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación (Watson, 1995). Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen, es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico” (Foote, 2002). Dichas alteraciones se traducen en un patrón irregular del movimiento, pérdida de motilidad, aumento de permeabilidad de membrana, disminución del metabolismo, pérdida de componentes intracelulares y disminución de energía (Watson, 1981).

El choque térmico provoca en las células otros efectos, como alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o “fases de transición lipídica”. Otro factor también correlacionado con la susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico, es la relación “colesterol/fosfolípidos”, habiéndose observado que una relación superior a 0'5 confiere una mayor resistencia al choque térmico. Debido a este fenómeno, la refrigeración previa a la congelación se lleva habitualmente a cabo con mucha precaución, de modo que el enfriamiento se realiza lentamente, aunque esto no evita que los cambios de temperatura originen alteraciones de membrana (Watson, 2000).

La susceptibilidad al choque térmico varía con las especies, estando los espermatozoides de toro y de cerdo entre los más sensibles, y manifestándose con marcadas alteraciones en el movimiento de iones, con acumulación de Ca^{2+} y pérdidas de K^+ y Mg^{2+} . Por el contrario, los espermatozoides de humanos, aves, perro y conejo, no muestran alteraciones tan marcadas. Algunos constituyentes de la membrana espermática son sumamente importantes dentro del grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico, tal es el caso de los fosfolípidos y los ácidos grasos. De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y morueco, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan un elevado ratio entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados que se encuentra entre 2'5 y 3'3. Por otra parte, los espermatozoides de conejo y humano presentan un ratio de 1 (Andrade, 2005).

En el toro, la dilución y refrigeración a 5°C provocan edema del acrosoma en el 50% de los espermatozoides (Andrade, 2005). La actividad respiratoria del espermatozoide disminuye, así como la glucólisis, lo que provoca una reducción en los niveles de ATP y por tanto, la pérdida de la motilidad. En síntesis, podemos mencionar que los daños provocados por el proceso de congelación y descongelación son los siguientes:

- Deshidratación celular, que provoca un aumento de la permeabilidad no selectiva de las membranas celulares a consecuencia de cambios en la

distribución de sus componentes, especialmente los lípidos, y la formación de “pliegues” en la membrana, debido a los cambios de volumen, que pueden llegar a producir el contacto y la eventual fusión entre membranas contiguas.

- Aumento de la concentración de solutos intra y extracelulares, que pueden resultar tóxicos para la célula.

- Estrechez de los canales de líquido extracelular no congelado, lo que impide la acomodación celular en los mismos, provocando deformación y posibles lesiones celulares (Holt, 2000).

2.5.4.1. Diluyentes

Entendemos por diluyente a la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Gadea, 2003). Durante años se han estado descubriendo, investigando y evaluando muchos medios para la dilución del semen, especialmente bovino, los cuales, antes de la década de 1950 sólo permitía conservar su vitalidad por 1, 2 ó en ocasiones hasta 4 días a 4°C en estado líquido o inclusive a temperaturas de 15-25°C (Sorensen, 1984); todo ello, en gran parte, gracias a que se descubrieron las propiedades de la yema de huevo que tenía la ventaja de disminuir la actividad metabólica de los espermatozoides, así como de prolongar la fertilidad de los mismos, conservándolos a una temperatura aproximada de 5°C (Salisbury *et al.*, 1982).

Entre los diluyentes utilizados desde el principio de la tecnología de IA bovina se encuentran (Derivaux, 1982):

1. *Diluyente de yema de huevo fosfatada* ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 2 \text{ g}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0'2 \text{ g}$ y H_2O destilada = 100 ml): A esta solución se le adiciona yema de huevo a una concentración del 20 al 50%, debiendo estar el pH final, comprendido entre 7 y 6'8. Este diluyente permite conservar la actividad fecundante del esperma durante algunos días, aunque presenta el inconveniente de hacer difícil el examen del esperma en el momento del

empleo debido a la presencia de grumos de grasa, frente a los cuales el fosfato no tiene ninguna actividad dispersante.

2. *Diluyente de yema de huevo citrada*: Es conocido que el esperma contiene ácido cítrico y que la adición de este producto a una solución Ringer-fosfato aumenta la vitalidad de los espermatozoides, y se demostró entonces, que un medio a base de citrato sódico era mejor que el de fosfato, y aseguraba mejor la vida y la fertilidad de los espermatozoides. El medio de citrato es muy simple de preparar, práctico y poco costoso; presenta además la ventaja sobre el medio de fosfato, de facilitar el examen microscópico, porque el citrato, agente quelante, se une al Ca^{2+} y otros metales pesados, ejerciendo así una acción dispersante sobre los glóbulos grasos de la yema de huevo.

3. *Diluyentes a base de leche*: La leche contiene fosfatos, citratos y azúcares, por esto, fue recomendado como medio de conservación por autores rusos, que empezaron a utilizarla en especies en los que el esperma era bastante difícil de conservar, especialmente en de garañón. Toda una serie de trabajos han demostrado que la leche homogeneizada, descremada pasteurizada, descremada en botes, y la leche en polvo reconstituida con antibióticos pueden, a condición de ser hervidas e incluso calentadas durante 10 min a 92 y 98°C, constituir buenos medios de dilución. La finalidad del calentamiento es destruir la actividad espermicida de la lactenina, proteína de la leche. Si a la leche se le añade además yema de huevo (5-15%), sus propiedades se verán mejoradas.

4. *Diluyentes gelatinados*: Se recomendó también un medio a base de fosfato-glucosa gelatinado, al que se le añadió un 10% de yema de huevo, siendo empleado a gran escala en Dinamarca; sin embargo, no ofrece ninguna ventaja sobre los medios anteriormente descritos.

5. *Diluyentes a base de leche de coco y yema de huevo*: Aseguran una mayor supervivencia a 2-3°C que el medio de citrato-yema de huevo.

6. *Otros diluyentes*: A base de extractos de músculo, corazón de buey, embriones de ternera, etc. Permiten una buena conservación, pero tienen la

desventaja de ser de preparación delicada, difíciles de esterilizar, y por tanto, de conservar, además de un precio elevado.

- *Adiciones empleadas en diluyentes:*

1. *Glucosa, fructosa y otros compuestos:* En los diluyentes suele agregarse un carbohidrato simple como glucosa o fructosa, como fuente de energía. Parece, sin embargo, que estos azúcares intervendrían más por su acción física al mantener la presión osmótica y un balance electrolítico conveniente para el medio, que por la energía metabólica que pudiesen proporcionar a los espermatozoides (Derivaux, 1982).

La *yema de huevo* y la *leche descremada* se utilizan contra los choques térmicos, ya que ambas sustancias suelen tener algunos nutrientes necesarios para la supervivencia de los espermatozoides. Pueden emplearse diversos tampones o *buffers* para mantener un pH cercano al neutro y sustancias para mantener una presión osmótica aproximada a 300 mOsm, equivalente a la del semen, como el plasma sanguíneo o la leche.

A raíz del descubrimiento de la acción protectora del glicerol, que reduce el daño mecánico durante la congelación-descongelación; y de la yema de huevo, que favorece la fertilidad de los espermatozoides, se han sentado las bases para que las técnicas de preservación sean adaptadas a todas las especies de animales domésticos, influyendo esto en importantes avances. Ambos componentes se han usado en la criopreservación durante más de 50 años, destacando su acción sinérgica en la protección de la membrana plasmática (Gil *et al.*, 2000). Así, la base primordial de los diluyentes de toros, en los que se ha preservado satisfactoriamente el semen, son los compuestos: Tris-(hidroximetil)-aminometano, glicerol, yema de huevo y azúcar (Tris-YE). Foote (1978) observó que dichas sustancias tampón, en combinación con la yema de huevo y el glicerol, favorecían el mantenimiento a 5°C y a -85°C.

2. *Agentes antimicrobianos:* Desde 1941 se puso atención al problema de los contaminantes microbianos en el eyaculado del toro. El nº de

microorganismos/ml puede fluctuar entre no detectable y varios millones; muchos no son patógenos, pero compiten con los espermatozoides por los nutrientes, produciendo compuestos metabólicos que tienen efectos adversos sobre la vitalidad de los espermatozoides. Existe la posibilidad de que se eyaculen algunos patógenos y de que otras fuentes contribuyan a la contaminación. En 1946, se descubrió el efecto benéfico de añadir antibióticos a los diluyentes de semen. Algunos de los antibióticos empleados en los diluyentes son: sulfonamidas, penicilinas, estreptomycinas y polimixina (Bearden, 1982).

- Propiedades de un diluyente de semen:

Según Carballo (2005) y Vallecillo (2011), un diluyente debe reunir las siguientes propiedades:

- Aportar nutrientes como fuente energética, para el metabolismo de los espermatozoides.
- Proteger contra el efecto nocivo del enfriamiento rápido.
- Impedir cambios perjudiciales en el pH, al formarse ácido láctico.
- Mantener la presión osmótica apropiada y el balance electrolítico.
- Inhibir la proliferación bacteriana.
- Incrementar el volumen de semen de modo que éste puede usarse en múltiples inseminaciones.
- Proteger las células espermáticas contra los daños producidos durante la congelación y descongelación.
- Preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo efecto sobre la fertilidad.
- Y además, deben ser de preparación fácil, estables y económicos.

- Diluyentes comerciales:

Bajo los criterios mencionados anteriormente, en los últimos años, los laboratorios comerciales han elaborado concentrados para la preparación de diluyentes de fácil uso a nivel de campo y sin la necesidad de tener que contar

con un laboratorio y equipo sofisticado. La lista de diluyentes comerciales para congelar semen de toro presentes en la bibliografía es la siguiente:

1. *Universal*[®] (IMV, Francia). Concentrado de dos pasos, con una porción glicerada y otra no glicerada. El concentrado se denomina “Concentrado buffer Europhos bovino” y contiene buffer de iones hidrogenados, ácido cítrico y carbohidratos; además de un frasco con antibióticos (antibióticos CSS) equivalente a 60 mg de tirosina, 300 mg de gentamicina y 180/360 mg de lincospectina, y una botella con glicerol (Manual *Universal* IMV, 1995).

2. *Triladyl*[®] (Minitübe, Alemania). Concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso en un solo paso, basado en Tris (Hidroxi-metil aminometano, un amortiguador sintético), y con H₂O bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructosa, además de los siguientes antibióticos por cada 100 ml: tirosina (5 mg), gentamicina (25 mg), espectinomicina (30 mg) y lincomicina (15 mg). Para su preparación, se adicionan tres partes de H₂O bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte del concentrado comercial (Manual *Triladyl*, 1993).

3. *Diladyl*[®] (Minitübe, Alemania). Concentrado para la preparación de un diluyente en dos pasos, constituido por una fracción “A”, una “B” (con glicerol) y una “C” con antibióticos (Catálogo *Minitübe*). Recientemente, *Minitübe* sacó al mercado un concentrado al que no se le adiciona yema de huevo para su elaboración.

4. *Biladyl*[®] (Minitübe, Alemania). Consiste en dos fracciones, A y B por paso, con una composición de Tris, ácido cítrico, glucosa, 20% de yema de huevo, 7% de glicerol, H₂O y antibióticos.

5. *Andromed*[®] (Minitübe, Alemania). Es un diluyente a base de lecitina de soja, de nueva generación en medios andrológicos, libre de ingredientes de origen animal para la congelación de semen bovino. Este medio tiene ventajas sobre sus antecesores, ya que ha logrado tasas de no retorno hasta 2'6% mayores que los diluyentes convencionales preparados a base de yema de huevo (67.85% con preparados con yema de huevo vs. 70.45% con diluyente sin yema de huevo); demostrado en un estudio de campo realizado en la Universidad *Justus-Liebig* (Giessen, Alemania), en el que se compararon los

porcentajes de no retorno al estro de 20.000 vacas (10.000 por grupo) inseminadas con eyaculados divididos y diluidos, en diluyentes convencionales de Tris+yema de huevo o en *Andromed* (Aires *et al.*, 2003). Los diluyentes sin yema de huevo presentan una serie de ventajas de interés:

- No tienen ingredientes de origen animal.
- No existe riesgo de contaminación bacteriana.
- Altas tasas de concepción, incrementa la tasa de no retorno.
- Fórmula antibiótica estandarizada.
- Fácil preparación con ahorro de tiempo.
- Fácil evaluación microscópica. Por ser altamente transparente permite una calidad de imagen óptima cuando se observa al microscopio, ya que no se observan las burbujas comunes en los diluyentes a base de yema de huevo o leche. De esta forma, los eyaculados de calidad cuestionable pueden ser detectados y evaluados más fácilmente.

- Otras aplicaciones. Debido a su excelente calidad, están indicados en la preservación de eyaculados con baja concentración o donde se requieren altas tasas de dilución. Es recomendado también en la investigación celular que usa a los espermatozoides como modelo y permite la evaluación del semen en sistemas computerizados como CASA (*Minitübe*, 2003).

6. *Biociphos*[®] (IMV, Francia). La dilución se realiza en un solo paso y contiene extracto de soja (lecitina de soja), reemplazando la yema de huevo.

7. *Bioxcell*[®] (IMV, Francia). Su medio de dilución se realiza en un paso y también contiene extracto de soja.

8. *Laciphos*[®] (IMV, Francia). Es un diluyente a base de leche desnatada en polvo que requiere la adición de agua.

9. *TRIS concentrador GIBCO BRL*[®] (*Holland Genetic*, Holanda). Su concentración es 5 veces mayor que el popular medio Tris-Base. Comúnmente, se ha usado en la congelación de semen bovino, aunque también ha sido utilizado como diluyente en semen fresco.

2.5.4.2. Crioprotectores

Las lesiones por la congelación del agua intracelular e intersticial pueden atenuarse mediante la adición de compuestos CPs en la elaboración de diluyentes (Lake y Stewart, 1978; Lake, 1986; Long, 2006). Por tanto, la función de estos CPs es la de proteger a las células de las lesiones producidas por la congelación. Siendo la acción de estos compuestos la de extraer el agua intracelular evitando la formación de cristales en el interior de la célula. La ausencia de CP producirá alteraciones en el núcleo que contiene el paquete cromosomal, daños en el acrosoma y de la estructura lipídica y canales iónicos de la membrana espermática.

En la actualidad, existen muchos tipos de CPs (**Tabla 3**) que se agrupan según las posibilidades de penetración o no en las membranas celulares. Se cree que los CPs actúan reduciendo la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando así los cambios en la concentración de solutos. Los CPs incrementan la probabilidad de supervivencia celular, pero a determinadas concentraciones resultan tóxicos para las células, por ello, debe establecerse un equilibrio entre la mínima cantidad necesaria que provea protección celular durante el proceso congelación-descongelación, y la máxima cantidad que no presente efectos tóxicos para las mismas (Bras, 2001).

Tabla 3. ¹CPs de bajo peso molecular (**CPBP**), ²CPs no permeables de bajo peso molecular (**CNPBP**), ³CPs no permeables de alto peso molecular (**CNPAP**).

CPBP¹	CNPBP²	CNPAP³
Glicerol	Galactosa	Polivinilpirrolidona
Etilenglicol	Glucosa	Alcohol Polivinílico
1,2 Propanediol	Sacarosa	Almidón Hidroxietílico
DMSO	Tretalosa	Hialuronidato de sodio
2,3 Butanediol	Lactosa	Otros polímeros
Metanol	Manosa	
Otros alcoholes	Otros azúcares	

La presencia de CNPBP es absolutamente necesaria en los ciclos de congelación-descongelación. Éstos reemplazan osmóticamente el agua intracelular antes del enfriamiento y se combinan con tasas lentas controladas de pérdida de calor. La eficiencia se ve en la reducción paulatina del volumen celular, minimizando así la formación de cristales dentro de las células. El efecto CP de los CNPBP ayuda a deshidratar la célula antes de someterla a enfriamiento y como resultado, se obtiene la mínima formación de cristales de hielo. Para la obtención de resultados efectivos y eficientes, los CPBP y los CNPBP deben utilizarse juntos. Los CNPAP, también utilizados en la criopreservación de gametos, tienen un uso más frecuente en la congelación de embriones, evitando la formación en tamaño y forma, de cristales en el interior de las células embrionarias (Mazur, 1984a,b).

Los CPs no permeables no penetran la membrana plasmática, y ejercen su acción en el medio externo. Estos azúcares realizan su efecto en el porcentaje de agua sin congelar a bajas temperaturas, disminuyendo la concentración de sales en los canales de agua (Amann y Pickett, 1987). El DMSO o el glicerol penetran de forma rápida a través de la membrana plasmática del espermatozoide, llegando al interior del citoplasma celular, ejerciendo su acción protectora, reemplazando el agua intracelular y disminuyendo el estrés osmótico provocado por la deshidratación, aunque manteniendo el volumen y disminuyendo el punto de congelación. Los CNPAP actúan osmóticamente, promoviendo la deshidratación celular durante la congelación, e impidiendo la formación de grandes cristales de hielo en el interior de la células (Watson, 1995). Estos agentes no disminuyen el efecto de la alta concentración intracelular de solutos (efecto solución) y, por tanto, son más efectivos en congelaciones rápidas.

Desde un punto de vista bioquímico es posible distinguir tres tipos de CPs: alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanodiol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y DMSO. Los CPs pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes, de acuerdo a la permeabilidad celular (Porcu, 2001).

- *CPs Penetrantes*: Son de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Se utilizan: glicerol, DMSO y propanodiol.

1. *Glicerol*. Es el CP más utilizado en los protocolos de congelación en todas las especies domésticas. Su descubrimiento como CP se debe a Polge *et al.* (1949) y ha marcado un avance notable en la criopreservación del semen. Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimentos extra e intracelulares (Mazur, 1984a,b). Sin embargo, Amann y Pickett (1987) sugieren que su principal efecto CP se ejerce a nivel extracelular, al aumentar la osmolaridad del medio externo, disminuir la concentración de sales, y aumentar el agua extracelular sin congelar a bajas temperaturas, aumentando los canales de agua descongelada.

Los efectos sobre la osmolaridad celular no son los únicos, el glicerol también parece ejercer un efecto directo en la permeabilidad de la membrana plasmática, disminuyendo su fluidez al formar uniones con las proteínas (Parks y Graham, 1992). Por otra parte, existe consenso en que a pesar de que el glicerol protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, también ejerce una cierta toxicidad celular, que afecta a la membrana plasmática (Hammerstedt *et al.*, 1990).

La concentración óptima para una determinada especie representa siempre un compromiso entre los efectos protectores y los efectos tóxicos (Watson, 1979). Por otra parte, la preservación de la motilidad y la integridad de las membranas (plasmática y acrosomal) exigen concentraciones de glicerol ligeramente distintas. En la congelación de semen de rumiantes como bovino, ovino y caprino, la totalidad de los trabajos publicados utilizan el glicerol como el CP principal, con una concentración óptima del 7% (Watson, 1979; 1995). La concentración óptima de glicerol para la congelación de semen bovino está también influenciada por otros componentes en el diluyente (Woelders *et al.*, 2003), con valores entre 0'25M (2'25%) y 1M (9%); varios estudios han demostrado un efecto tóxico más allá de esta concentración (Fahy, 1986).

2. *DMSO*. Desde el descubrimiento de sus propiedades, el DMSO se ha usado como un CP cuya acción se atribuye principalmente a su habilidad para prevenir la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelación, además de la formación de los cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana; su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa fosfolípida, así como también influye en los procesos de solvatación de agua. Se han sugerido las interacciones electrostáticas de DMSO con fosfolípidos, lo que parece ser crítico para la crioprotección de la membrana (Porcu, 2001).

3. *1,2-Propanodiol*: Ha sido utilizado principalmente para la congelación de blastocistos y embriones en estado de preimplantación en humanos y otras especies (Porcu, 2001).

- *CPs No-Penetrantes*: Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación. Son importantes por ejercer su acción promoviendo la rápida deshidratación celular, y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano.

- *Yema de Huevo*: Además de los CPs mencionados anteriormente, la yema de huevo ha sido también utilizada ampliamente desde muchas décadas atrás, por su alto poder amortiguador. Actualmente, varios autores confirman que se utilizaba en la mayoría de animales domésticos, así como en especies exóticas (Holt, 2000). Phillips (1939) fue el primer autor en describir el efecto protector que la yema de huevo tiene sobre la membrana espermática y acrosoma del espermatozoide frente al “choque térmico”, siendo todavía un constituyente habitual de los diluyentes usados en la congelación del esperma bovino. La yema de huevo posee unas fracciones lipídica (fosfolípidos, lecitina, cefalina) y proteica que han demostrado tener un efecto CP frente al choque térmico durante el proceso de refrigeración, congelación y descongelación.

La cantidad de yema de huevo, comúnmente usada como medio de congelación de semen, está entre el 15 y el 30%. Estos rangos de concentración se basan en resultados obtenidos por varios autores, donde el porcentaje de espermatozoides móviles post-descongelado son óptimos. Recientemente, se ha estandarizado que la proporción de yema de huevo en diluyentes comerciales de toro sea del 20% (Amirat *et al.*, 2004).

- *Lipoproteínas de Baja Densidad*: Dadas las necesidades de control de enfermedades, y por consiguiente, de eliminación de sustancias biológicas para la conservación de material criopreservado, existe una fuerte tendencia a que la yema de huevo sea sustituida. En este sentido, se ha propuesto el uso de diluyentes con aditivos naturales, como la lecitina de soja (Jiménez *et al.*, 2004); ya es posible encontrar en el mercado diluyentes comerciales para toros a base de lecitina de soja (*Biociphos*[®] o *Bioexcell*[®]).

Se ha sugerido recientemente, que las lipoproteínas de la yema de huevo protegen a los espermatozoides durante la congelación-descongelación, debido a que éstas se unen a las proteínas del plasma seminal presentes en el semen, secuestrándolas en su mayoría, y por tanto, impidiendo su efecto negativo sobre la membrana espermática. Se han realizado estudios, como los de Amirat *et al.* (2004), en los que se describe una técnica para la purificación de la yema de huevo por ultracentrifugación en un gradiente de densidad. De esta forma, se obtiene la fracción denominada “*Low-Density Lipoprotein*” (LDL), realizándose además, esfuerzos para probar si la fracción LDL tiene las mismas propiedades protectoras que la yema de huevo entera.

La mayoría de estudios consultados reportan un efecto positivo sobre la motilidad del semen, ya que la proteína de baja densidad actúa muy bien como amortiguador. Amirat *et al.* (2004) estudian y comparan la fertilidad después del proceso de congelación y descongelación utilizando yema de huevo entera en diluyente comercial (*Optidyl*[®]) o en LDL, encontrando que no existen diferencias significativas entre ambos, por lo que concluyen que la LDL puede ser utilizada para la conservación de semen.

2.5.4.3. Concentración espermática de dosis seminales

El nº de espermatozoides para la constitución de una dosis seminal fértil es mucho mayor, a veces más del doble, para el semen congelado que para el refrigerado. La situación se agrava cuando el semental del que se extrae el semen pertenece a una raza que no ha sido seleccionada por su aptitud reproductiva, con lo cual, el nº de esp/dosis fértil ha de ser aún mayor. A veces, no solo el problema se encuentra en aumentar el nº de células espermáticas vivas, sino que también es necesario considerar la situación particular de la población de esa raza, caso de un pequeño nº de sementales donde no se puede elegir entre diferentes animales, ya que hay que conformarse con lo que queda (Poto y Peinado, 1999).

Uno de los conceptos principales con respecto a la evaluación de la fertilidad de los toros, es la relación calidad/cantidad de espermatozoides. Dentro de este concepto propuesto por Salisbury (1961), se considera que para una “*característica*” dada del semen, la fertilidad aumenta en función del incremento de la misma hasta un valor máximo a partir del cual los factores limitantes son otras características del semen o la población de hembras.

Esta “*característica*” puede ser: 1) un factor cualitativo del eyaculado (motilidad, proteínas del plasma seminal, etc.), 2) el nº de espermatozoides inseminados, o 3) el nº de espermatozoides con una característica particular. Pace *et al.* (1981), así como Den Das (1992) demostraron que esta relación con la fertilidad existe realmente para el nº de espermatozoides que posean una serie de criterios de vitalidad. Es decir, que el nº de espermatozoides inseminados (y no el porcentaje) que presentan ciertos parámetros de vitalidad (motilidad progresiva, integridad del acrosoma, aptitud para reaccionar a la prueba de resistencia osmótica, etc.) está correlacionado con la fertilidad. En lo que respecta al nº de espermatozoides con motilidad progresiva, Pace *et al.* (1981) informaron que la tasa de no retorno (TNR) a 90 días disminuyó en 4'9% cuando el nº de espermatozoides móviles post-descongelación pasó de 8 a 2×10^6 esp/dosis.

En otro estudio, Foote y Parks (1993) remarcaron que la fertilidad disminuyó un 1% ($p < 0.05$) cuando el nº de espermatozoides totales pasó de 24 a 12×10^6 esp/dosis. Sin embargo, este efecto de la disminución eventual de la fertilidad en función del nº esp no se observa en todos los toros.

Por otro lado, es importante señalar que los toros catalogados como "poco fértiles" no podrán alcanzar una fertilidad correcta o comercialmente aceptable, a pesar de utilizar dosis de semen altamente concentradas en espermatozoides (Humblot, 1986). Januskauskas *et al.* (1996) compararon los resultados de fertilidad obtenidos con 5 toros que fueron utilizados en IA con una concentración de $10-15 \times 10^6$ esp/dosis. Dos toros mantuvieron su fertilidad, mientras que los otros tres perdieron de un 3'4 a un 4'7% de TNR a 56 días. Es interesante resaltar que el toro con peores resultados de fertilidad era menos fértil aún con 15×10^6 esp/dosis (Oses *et al.*, 2008).

Como regla general, los toros poco fértiles requieren más esp/dosis para alcanzar su valor máximo de TNR (Stalhammar *et al.*, 1994). A su vez, este tipo de toros no alcanzan una TNR dentro de lo que puede considerarse como aceptable, a pesar de aumentar la concentración espermática por pajueta.

- *Elección del nº esp/dosis:* Con motivo de simplificar el trabajo, la mayoría de los CIA utilizan un objetivo común para todos los toros, que se expresa con el nº de esp/dosis o nº de esp con motilidad progresiva/dosis.

La existencia de numerosas fuentes de variación de fertilidad (toro, eyaculado, estación del año, nº esp, IA, hembra) impone al CIA escoger un nº de esp/dosis bastante elevado, lo cual establece un cierto margen de seguridad. Esto justifica el empleo de cantidades altas de esp/dosis en toros de razas lecheras (aprox, 20×10^6 esp/dosis), lo cual, según el porcentaje de esp con motilidad progresiva obtenido post-descongelación (por ej. 30-50%), permite disponer de $6-10 \times 10^6$ esp con motilidad progresiva/dosis para la gran mayoría de los eyaculados. La TNR con 90 días de promedio que se puede esperar según la fórmula de Pace *et al.* (1981) sería del 70'4 y 71'4%, respectivamente.

2.5.4.4. Sistemas de envasado

Los envases utilizados tienen mucho que ver con el éxito de supervivencia de los espermatozoides. Es escasa la bibliografía existente sobre el método de envasado del esperma congelado/descongelado, sin embargo, existen algunos estudios en morueco, donde se obtienen los mejores resultados de fertilidad con el esperma envasado en *pellets* (Maxwell *et al.*, 1995). Aun así, la demanda de mercado hace que otros tipos de envases tomen, hoy por hoy, una mayor importancia, como son por ejemplo, las pajuelas francesas de 0'25 y 0'5 ml, selladas con alcohol de polivinilo o por ultrasonido (Garde, 1992).

En los estudios pioneros en esta área, los espermatozoides de cerdo se congelaban en ampollas o en tubos de vidrio (Polge *et al.*, 1970), usando bajas tasas de congelamiento junto con concentraciones de glicerol relativamente altas. Después, las técnicas de congelación de semen de toro, se adaptaron al semen del cerdo, disminuyendo las cantidades de glicerol del 1 al 3%, para conseguir congelaciones rápidas (Pursel y Johnson, 1975). Los espermatozoides de cerdo también han sido congelados en maxipajuelas (5 ml), pajuelas de aluminio (4-5 ml), pajuelas (0'5 ml) y en minipajuelas (0'25 ml) (Eriksson, 2000). Esta variedad de envases busca albergar una cantidad suficiente de espermatozoides que permitan una distribución homogénea de la temperatura. Los envases nos permiten almacenar de forma sencilla el semen crioconservado en el tanque de N₂L, facilitándonos la identificación de los diferentes eyaculados (Eriksson, 2000).

Los actuales métodos de envasado de semen de toro se basan principalmente en las minipajuelas francesas de 0'25 ml (Christensen *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000; Thum *et al.*, 2002; Muiño *et al.*, 2007; Muiño *et al.*, 2009; Contri *et al.*, 2010). El procedimiento ha estado en funcionamiento durante muchos años, y en general ha funcionado bien para el semen envasado y congelado. Aunque no podemos obviar que también se usan las minipajuelas de 0'50 ml (Koivisto *et al.*, 2009; Guimaraes *et al.*, 2010).

Estudios realizados por Clulow *et al.* (2008), indican que en la congelación en pajuelas de 0'25 y 0'50 ml, no se observan diferencias significativas en los parámetros evaluados después de la criopreservación del semen. Para la congelación de espermatozoides de carnero usando pajuelas de 0'5 ml, han sido reportadas mejoras de la motilidad post-descongelado, en comparación con pajuelas de 0'25 ml (Maxwell *et al.*, 1995). Estos autores plantearon la hipótesis de que la diferencia en el área de superficie, con la tasa de volumen entre los dos tamaños de pajuela, resulta en una tasa de congelación más lenta para las pajuelas de 0'50 ml, lo que resultó beneficioso para los espermatozoides de carnero.

2.5.4.5. Curvas de temperatura

El proceso de congelación expone a las células espermáticas a una pérdida de agua y a un incremento de la concentración de solutos intra y extracelulares. La búsqueda de una velocidad óptima de congelación, para prevenir la formación de cristales intracelulares y minimizar el tiempo de exposición a la concentración de solutos, es un hecho de mucha relevancia, ya que de ello depende el éxito de un proceso de congelación. La disminución de la temperatura debe realizarse de forma más o menos lenta, con el fin de mantener las características de las proteínas del plasma seminal que interaccionarán con las del núcleo espermático (Mazur, 1984a,b).

Se han desarrollado un gran nº de protocolos de congelación, debido principalmente a las diferencias observadas entre especies, sin que se haya determinado con exactitud una curva estándar. Esto se debe principalmente a que los resultados dependen de factores tales como los diluyentes, CPs, calidad seminal (parámetro altamente variable entre individuos), etc. (Woelders *et al.*, 2003). Aunque se han realizado investigaciones para determinar la tasa óptima de congelación y la adaptación de las curvas de enfriamiento individuales para cada toro, ha habido muy poco progreso en un sentido práctico (Vishwanath y Shannon, 2000).

El semen de toro se colecta en general sobre tubo seco y estéril sin diluyente. Un estudio reciente (Wendee, 2007) narra las bondades de realizar la colecta sobre un dispositivo llamado BreedMaX® que contiene diluyente en su interior a 37°C antes de realizar la colecta. No obstante, el semen de toro puede permanecer sin diluyente en un baño de agua termostaticado durante un periodo de 30 min. En efecto, a finales de los años 60, algunos CIA practicaban este método llamado "*holding*" (mantenimiento del semen puro 10-30 min en baño atemperado a 37°C antes de la dilución). Es en parte lo que se sigue realizando cuando dos colectas se hacen sucesivamente a 20 min de intervalo, sin embargo, algunas veces se aconseja que en eyaculados altamente concentrados ($>2 \times 10^9$ esp/ml) se realice una predilución.

Gran parte de los cuidados y tiempos usados en el laboratorio de los CIA son destinados a evitar el choque térmico. Por regla general, después de recogido, el semen debe enfriarse a 4-5°C de forma gradual (1'5-2 h), y luego equilibrado (tiempo de espera a 4-5°C hasta congelación) durante 3-24 h. Poco se ha experimentado con la primera fase de la curva (37°C hasta 4-5°C). Así por ejemplo, diluyendo y llenando las pajuelas a temperatura ambiente, se han obtenido buenos resultados de motilidad y vitalidad con semen calificado mediocre al examen post-extracción, bajando la temperatura de 20°C a 4°C en 160 min a una velocidad de 0'1°C/min en congelador programable. Es posible que este tipo de descenso de la temperatura sea mas regular, homogéneo y lento que el enfriado en masa realizado en recipientes donde la técnica no esta estandarizada (Wendee, 2007). Sin embargo, numerosas experiencias han sido realizadas con el equilibrado y han mostrado que es más importante el tiempo de incubación del semen diluido a 4-5°C que el tiempo en el que el semen esta en presencia del glicerol (Salisbury *et al.*, 1978).

Los trabajos de Gilbert y Almquist (1978), así como de Frijters *et al.* (2003) están a favor de un equilibrado prolongado (9 y 16 h), respectivamente, debido a una mejor motilidad, porcentaje de acrosomas normales y vitalidad (integridad de la membrana) obtenida frente a periodos de equilibrado más cortos. El uso de tiempos de equilibrado largos fue experimentado por Foote y Kaproth (2002), quienes compararon en un test a gran escala (14.000 IAs) dos

tiempos de equilibrado del semen bovino diluido en diluyente a base de leche: 4 vs. 28h, sin observar diferencias significativas en la fertilidad.

Pribenszky *et al.* (2006) presentaron una mejora substancial de los resultados a la descongelación y de la fertilidad del semen bovino después que las pajuelas fueran tratadas con presión de 300 bar durante 90 min a temperatura ambiente antes de practicar el enfriado a 4-5°C. Esta estrategia puede ser interesante para toros de baja congelabilidad, no obstante, es necesario que se evalúe con un nº de toros importante.

El tipo de envasado usado para contener el semen: pajuelas finas, medias, *pellets*, etc., tienen influencia en la curva de congelación, sin embargo, son escasos los artículos científicos que han comparado un eyaculado fraccionando la calidad de cada envasado frente a la fertilidad a campo. Por regla general, no existen diferencias significativas de fertilidad entre las pajuelas finas y las medias (Kupferschmied, 1982).

Las técnicas de congelación del semen en sí han evolucionado de forma importante en estos últimos 10 años. Hoy en día, la mayoría de los CIA poseen congeladores programables que permiten modular la curva de enfriado en ritmos de 0'1°C/min hasta 60°C/min. La curva de descenso de temperatura para el semen bovino puede realizarse a diferentes velocidades (Saacke, 1982), sin embargo, los mejores resultados son obtenidos con una velocidad de descenso de 40-50°C/min entre -10 y -100°C.

El semen de toro puede ser congelado en congeladores de vapores estáticos, vapores de N₂L o mediante el uso de congeladores programables. La mayor parte de los trabajos publicados utilizan congeladores programables a un ritmo de congelación de 5°C/min; de 5°C a -10°C; de -40°C/min; de -10°C a -100°C; de -20°C/min y de -100°C a -140°C (Muiño *et al.*, 2007; 2009; Contri *et al.*, 2010). Además, en la bibliografía encontramos otras pautas de congelación, de 5°C/min; de 5°C a -10°C; -40°C/min y de -10°C a -150°C (Gil *et al.*, 2000). Christensen *et al.* (1999) proponen un ritmo de congelación más agresivo, de de 5°C a -120°C a -60°C/min y transfiriendo luego a N₂L. En relación a la

congelación en vapores estáticos de N₂L, algunos CIA aún lo siguen utilizando, aunque este sistema presenta grandes desventajas, ya que las muestras seminales están sometidas a condiciones incontrolables de congelación.

La ventaja de congelar en vapores estáticos es que todas las pajuelas en cualquier ciclo dado de congelación, están sujetas a las mismas tasas de enfriamiento, porque las pajuelas están colocadas a un solo nivel del N₂L. En cambio, en los congeladores programables las pajuelas están colocadas en más de un nivel, y ello contribuye a considerables variaciones en la tasa de congelación (Vishwanath y Shannon, 2000).

El uso de vapores de N₂L se hace mayormente en cajas de materiales resistentes a cambios de temperatura agresivos. Este sistema es muy parecido al anterior. Las pajuelas son colocadas comúnmente a una altura de 4 cm sobre el nivel de N₂L, por un periodo de exposición de 10 min (Amirat *et al.*, 2004). El ritmo de congelación depende exclusivamente de la distancia que existe entre las pajuelas y el nivel de N₂L, siendo por lo general de 60°C/min. Trabajos llevados a cabo por diferentes autores, como Cochran *et al.* (1984), no han encontrado diferencias significativas en la motilidad post-descongelado del semen a distancias variables sobre la superficie del N₂L.

En la bibliografía, encontramos discrepancias entre autores en lo que respecta al tiempo de exposición a vapores de N₂L, así como en la distancia de separación entre las pajuelas y la superficie del N₂L. De esta forma, según Hidalgo (2004) se observa mejor vitalidad espermática cuando se colocan las pajuelas a una distancia de 2 cm sobre la superficie del N₂L durante 8-9 min. Para Vázquez *et al.* (1998), la congelación en vapores de N₂L debe realizarse durante al menos 10 min.

2.5.4.6. Almacenamiento de dosis seminales

La calidad de un semen muy fértil puede deteriorarse rápidamente si se maneja o se almacena descuidadamente. El semen debe de ser procesado bajo normas estrictamente controladas y sujetas constantemente a pruebas de

control de calidad. El semen bovino congelado puede guardarse durante un tiempo indefinido si se mantiene de forma constante a temperaturas muy bajas. La temperatura crítica es -44.4°C (-112°F), por lo tanto, las muestras sometidas a temperaturas que excedan de este valor, incluso durante un período corto de tiempo, suelen dañarse, a pesar de un rápido retorno a las temperaturas de almacenamiento. La magnitud del daño dependerá del lapso de tiempo que el semen se expone a temperaturas elevadas. Aunque es fácil mantener el semen congelado a una temperatura segura (Quintero y González, 2005).

Los fabricantes no estaban interesados en mejorar los tanques de almacenamiento y transporte de semen, hasta que *J. Rockefeller Prentice*, dueño del Servicio Americano de Criadores, privadamente proporcionó una suma de dinero sustanciosa, que convenció a la división *Linde (Cyanamid)*, de que había mercado para contenedores de N_2L con un aislamiento mejorado. La exitosa criopreservación del esperma y el desarrollo de los contenedores de N_2L proporcionaron los cimientos en los que se sustenta actualmente la industria de la criopreservación de semen (Foote, 2002).

En la práctica diaria de IA, las células espermáticas sufren más alteraciones en el termo de trabajo del inseminador que en el termo de la estación de la granja, debido a la existencia de mayores factores adversos de manejo, manipulación, variaciones de temperatura e influencias medioambientales. Se plantea que la regularización de la temperatura es uno de los factores más importantes a considerar cuando se manipula el semen. Las fluctuaciones de la temperatura ocasionan que la calidad del semen se deteriore rápidamente. Por ello, los cambios de temperatura deben ser mínimos. La manera en la que se maneje el semen puede afectar la tasa de concepción de todo el rebaño (Duarte, 2006).

En relación con el semen post-descongelado sometido a las pruebas de resistencia a la exposición a 37°C en el banco de semen del CIA, los valores obtenidos de motilidad progresiva en la 1ª h fueron buenos (44.16 ± 1.67). También fueron buenos los resultados de la viabilidad en la 2ª h. Y aunque hubieron diferencias significativas ($p < 0.01$) al comparar las medias de la

motilidad progresiva post-descongelación ($47'48 \pm 1'67$) y la resistencia espermática en la 2ª h ($40'00 \pm 2'14$), ambas cifras se correspondieron con valores considerados normales de calidad del semen. Estos resultados, muestran que el semen congelado almacenado en el banco, prácticamente no sufre variaciones biológicas y funcionales durante muchos años. Se ha evaluado semen almacenado de 1 a 20 años sin que se reportaran afectaciones morfológicas, bioquímicas y funcionales significativas en los espermatozoides (Tamayo y Duvergel, 1992).

2.5.4.7. Descongelación

La descongelación es el proceso por el cual una sustancia que se ha solidificado por la pérdida de calor cambia al estado de líquido con la ganancia de energía procedente del medio que le rodea. Existen diversos procesos para realizar el cambio de estado en las dosis seminales criopreservadas bovinas. La ganancia de temperatura se realiza sumergiendo la pajuela dentro de un termo atemperado a 37°C, 30 seg. En estudios de mayor precisión se utiliza la inmersión en baños termostatzados a 56°C, 12 seg (Thilmant, 1997), en la especie porcina. Aunque diversos autores proponen una descongelación rápida a 52°C, 12 seg para envases de semen porcino de 0'5 ml (Sellés *et al.*, 2003).

La viabilidad post-descongelación se determina mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático. Durante la congelación-descongelación los daños que se producen en la membrana pueden no ser completamente expresados inmediatamente después de la descongelación. Por ello, el semen debe ser incubado a 37°C, 2 h en una evaluación conocida como prueba de termorresistencia o de incubación. El semen descongelado de buena calidad normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva. Después de 2 h de incubación, estos valores disminuyen un 10-15% (Catena y Cabodevila, 2002).

Los controles de calidad espermática aseguran alta fertilidad, pero no es suficiente que una muestra de semen tenga buena motilidad después de la descongelación, es necesario que varias pajuelas de cada extracción sean

sometidas a una prueba de estrés antes de determinar la motilidad y la integridad de membrana. Se ha demostrado que la evaluación después de la prueba de estrés tiene mayor correlación con la fertilidad que la evaluación de motilidad inmediatamente después de la descongelación. Además, la morfología del semen debe ser evaluada en todos los toros (Dejarnette, 2010).

La criopreservación, cuyo propósito es garantizar la supervivencia de los espermatozoides, ocasiona un daño irreversible a las membranas plasmáticas y causa la muerte celular o cambios parecidos a los de la capacitación espermática, que dificultan la capacidad para interactuar con el ovocito en la fecundación. Si bien, los procesos de congelación y descongelación afectan a una gran proporción de espermatozoides, existe gran variación entre individuos, algunos con menos afectaciones que otros (Vera, 2003).

2.6. Recongelación espermática

La posibilidad de realizar la recongelación de semen descongelado podría tener importantes beneficios para el futuro de la tecnología reproductiva animal. Algunos de los beneficios que podría aportar sería el de mejorar las probabilidades de fertilización cuando el semen esté criopreservado en grandes cantidades, en suministros limitados, se trata de un semen muy valioso o ha sido descongelado por equivocación (Owiny *et al.*, 2010).

Los programas de conservación genética para especies en peligro de extinción y ganado en general están basados fundamentalmente en la criopreservación del material genético masculino. Para cumplir con las cambiantes regulaciones higiénicas cuando el semen se descongela, es necesario purificar los espermatozoides y tratarlos con antibióticos específicos antes de realizar la recongelación para su envío al mercado y permitir el intercambio de material genético entre países (Maxwell *et al.*, 2007a,b).

La realización del sexado de los espermatozoides entre ciclos de congelación-descongelación, es una de las principales finalidades de la recongelación (Vázquez *et al.*, 2009). Sin embargo, esta técnica posee un

coste muy elevado en cuanto a instalaciones y mantenimiento, por lo que existen muy pocos laboratorios en los que se pueda realizar. Por lo tanto, para la realización del sexado es necesario enviar las muestras biológicas desde el punto de recogida en el campo a un laboratorio que ofrezca este servicio. Puesto que la refrigeración de las muestras para su envío al laboratorio especializado puede ser perjudicial incluso controlando las limitaciones como el tiempo y temperatura, la recongelación espermática sería la solución al principal problema de este tipo de transporte: la caducidad de las muestras espermáticas (Álvarez, 2012).

La congelación-descongelación en dos o más ciclos ya ha sido realizada en varias especies de animales domésticos con el fin de mejorar los recursos genéticos disponibles, reduciendo así los costes que supone el almacenamiento (Saragusty *et al.*, 2008), así como también en el caso del sexado de espermatozoides por citometría de flujo (Maxwell *et al.*, 2007a,b).

Un estudio sobre las características del semen recongelado equino con diferentes diluyentes concluye que el semen equino puede ser recongelado con el objetivo de obtener un mayor nº de pajuelas del mismo animal para ser utilizadas en programas de ICSI, además de concluir que en esta especie es posible la recongelación del semen como opción para preservar y optimizar el uso de material genético valioso para el futuro de la reproducción asistida (McCue *et al.*, 2004a,b). También ha sido estudiada la recongelación en cabra con el objeto de crioconservar el semen que ha sido descongelado de forma errónea (Carwell *et al.*, 2010).

En el campo de la reproducción humana se ha realizado la congelación-descongelación del semen hasta en tres ciclos con buenas características espermáticas tras los mismos (Bandularatne y Bongso, 2002), e incluso se ha recongelado semen humano mediante N₂L (Verza y Esteves, 2004) y estudiado la resistencia de los mismos a los daños producidos tras las repetidas congelaciones realizadas (Verza *et al.*, 2009). También se ha utilizado la recongelación espermática en pacientes con cáncer testicular, obteniéndose resultados positivos tras el primer intento de FIV (Franco y Borges, 2010).

La eficacia de la recongelación espermática en cuanto a fertilidad final obtenida se demuestra en diversos trabajos (ovino: Hollinnshead *et al.*, 2004a,b; De Graaf *et al.*, 2007; Morton *et al.*, 2006; toro: Arav *et al.*, 2002; caballo: McCue *et al.* 2004a,b.). Choi *et al.* (2006) emplearon semen recongelado para la realización de ICSI en caballo y obtuvieron unos resultados de desarrollo embrionario temprano sin diferencias con respecto al semen control que tan solo había sido sometido a una congelación.

Por otra parte, las pérdidas de calidad seminal que se producen durante la recongelación podrían ser menores con la utilización de gradientes de selección espermática, que usado entre dos ciclos de congelación consecutivos podrían mejorar la calidad de las muestras, lo que ayudaría a seleccionar la población con mayor motilidad (Nicolás *et al.*, 2012), y mejorar el proceso de sexado espermático con el aumento en la proporción de espermatozoides vivos tras la separación de espermatozoides X e Y (Álvarez, 2012).

Existen referencias sobre la eficacia obtenida tras la IA de vacas con semen redescongelado. Arav *et al.* (2002) indican que el semen que ha sufrido doble congelación puede obtener una fertilidad muy próxima a la de vacas inseminadas con semen congelado convencional. Aunque según el tipo de tratamiento realizado, los resultados de gestación tras la IA de vacas con semen recongelado pueden diferir. Así, una sola gestación fue obtenida después de la IA de semen sexado por citometría de flujo cuando fueron inseminadas doce vacas; esto significa que mejorando las técnicas de manejo del semen después de una vez descongelado y las de posterior recongelación, se podría aumentar la fertilidad post-IA (Undserwood *et al.* 2010a).

Además, y a falta de una mayor cantidad de estudios, el semen recongelado parece estar influido por el donante, con diferencias significativas de fertilidad entre toros; teniendo esto relación con la fertilidad obtenida para los toros cuando solo se utiliza semen una sola vez congelado. Siendo mayor la fertilidad del semen recongelado de toros que tienen una fertilidad mayor que con semen sólo congelado (Underwood *et al.*, 2009b).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales

Para la realización de este estudio se han tenido en cuenta en primer lugar, los valores promedio de los parámetros seminales de 12 toros de raza ML, con edades comprendidas entre 2 y 4 años, considerados toros jóvenes (ML2, ML6, ML8, ML9, ML11, ML12 y ML13) y de más de 4 años, considerados toros adultos (ML1, ML3, ML4, ML5 y ML7), cuyas dosis seminales se conservan en el Banco de Germoplasma del IMIDA, con el objeto de conocer las relaciones y similitudes de todos los donantes de semen con los resultados obtenidos en el apartado de semen congelado y recongelado bovino. Estos valores pertenecen a todas las recolecciones seminales de los sementales que han existido en las ganaderías desde que se iniciaron las actividades de conservación de esta raza.

Para llevar a cabo el resto de apartados que figuran en este documento se han seleccionado 6 toros extemporáneos entre sí de la raza ML de todos los que componen el Banco de Germoplasma y ubicados en granjas de criadores inscritos en el Libro Genealógico de la raza. Las denominaciones que fueron asignadas a cada uno de los toros para facilitar el estudio y su lugar de procedencia, son las otorgadas en el Libro Genealógico de la raza y que a continuación se detallan:

ML2 (toro ML nº2): Animal procedente de una explotación situada en *La Orilla del Azarbe* (Murcia).

ML3 (toro ML nº3): Animal procedente de una explotación situada en *Beniaján* (Murcia). Nº R.E.G.A: ES300304900003.

ML5 (toro ML nº5): Animal procedente de una explotación situada en *El Mojón* (Alicante). Nº R.E.G.A: ES300303740101.

ML8 (toro ML nº8) y ML9 (toro ML nº9): Animales procedente de una explotación situada en *Dolores* (Alicante). Nº R.E.G.A: ES030640000024.

ML11 (toro ML nº11): Animal procedente de una explotación situada en Alquerías (Murcia). Nº R.E.G.A: ES300300500006.

3.2. Obtención de semen: electroeyaculación

La obtención de semen de toros por el método de la electroeyaculación ha permitido el establecimiento de bancos de germoplasma de machos reproductores seleccionados (Barrios, 2002).

A los toros del estudio se les extrajo el semen mediante un electroeyaculador (*ElectroJac 5, Ideal[®] Instruments*). Para ello, se introdujo la sonda del electroeyaculador en el recto del animal; a continuación se aplicó un voltaje de entre 10 a 24 V según la respuesta individual del semental, controlado manualmente hasta que éste exteriorizara el pene. Una vez que los toros comenzaron a eyacular, se recogieron los eyaculados con el colector de semen. El semen se depositó en un tubo de recogida atemperado para evitar cambios bruscos de temperatura que afectaran la calidad del eyaculado.

3.3. Experiencia 1. Parámetros seminales en toros de raza ML

Una vez obtenido el semen se realizó una valoración inicial de la calidad del eyaculado, realizada siempre por el mismo operario, mediante los parámetros fisicoquímicos de color, olor volumen y pH, además de otros parámetros (concentración, motilidad y vitalidad) que se detallan en este apartado:

3.3.1. Color, olor, volumen y pH

El color y el olor fueron medidos de forma subjetiva eliminándose aquellos eyaculados que no presentaron color y olor acordes con lo esperado.

La medida del volumen del eyaculado tras su recolección es imprescindible para poder determinar el nº de dosis a preparar, así como la cantidad de diluyente que se adiciona para su posterior congelación. El

volumen fue medido en tubos graduados previamente esterilizados en autoclave (*Selecta, Micro7*).

El pH del semen fue medido con tiras de papel indicador *Lyphan*[®] (rango pH 6'6-8'1), siendo este rango el que se esperaba encontrar como pH normal del semen de toro.

3.3.2. Concentración espermática

Para la medición de la concentración espermática se utilizó la técnica de turbidimetría utilizando el fotómetro *Spermacue*[®] (*Minitübe, Alemania*) calibrado para la especie bovina. Para ello se tomó una alícuota de 25 µl con pipeta automática y se colocó en la microcubeta de *Spermacue*[®].

El fotómetro realiza una medición de forma indirecta, relacionando el grado de absorción o dispersión de la luz que provocan los espermatozoides de una muestra de esperma con su concentración. Sin embargo, para que este método se muestre preciso, requiere una calibración previa mediante una curva determinada por recuento microscópico en cámara, debido a que la transmitancia varía de acuerdo a la concentración espermática. Además, depende también del tamaño y forma del espermatozoide o del índice de refracción, factores que son variables entre individuos (Mocé y Graham, 2008).

3.3.3. Motilidad espermática masal

La evaluación de la motilidad masal se realizó de forma subjetiva. Para ello, se colocó un volumen de aproximadamente 10 µl en un portaobjetos previamente atemperado a 37°C en platina térmica. La muestra fue evaluada bajo microscopio óptico (*Leica, DM-2000*) con platina térmica y a 100 X para observar así el movimiento en masa de los espermatozoides, preferentemente observándolos en el límite entre la gota seminal y el portaobjetos. La clasificación de los eyaculados bovinos según su motilidad masal se detalla en la **tabla 4**.

Tabla 4. Clasificación de la motilidad masal en eyaculados bovinos (Vera, 2003).

Valor	Clasificación	Descripción
1	Pobre	No hay ondas. Movimiento espermático vibrátil.
2	Aceptable	Ondas ligeras con movimientos apenas perceptibles.
3	Bueno	Ondas aparentes. Remolinos con movimientos moderados.
4	Muy Bueno	Ondas oscuras con movimientos rápido.

El baremo 1-4 difiere de lo establecido por Bonadonna (1962), que lo estableció en 5 categorías, siendo el primer valor el 0, definido como aquel semen que no tiene ningún tipo de movimiento. Esta evaluación se realizó en todos los eyaculados obtenidos para proceder a la utilización posterior del semen. En caso de obtenerse valores inferiores a 3, fue desechado el eyaculado. Los datos de este examen no se reflejan en los resultados, dada su elevada subjetividad.

3.3.4. Vitalidad

3.3.4.1. Porcentaje de espermatozoides vivos y motilidad individual

La evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos se realizó de forma subjetiva bajo microscopio óptico de campo claro (*Leica, DM-2000*) con platina térmica a 100 X; para ello, se realizó una dilución 1:2 de semen en medio *Tyrode*. Además, se llevó a cabo la valoración subjetiva de la motilidad individual de todas las poblaciones espermáticas que se presentaron en cada campo microscópico. Valorándose mediante una escala subjetiva (0-5) según el tipo de movimiento espermático y su velocidad (Bonadonna, 1962). Se utilizaron los eyaculados que presentaron como mínimo un porcentaje del 50% de espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo por encima de 3.

3.3.4.2. Tinción vital: integridad de membrana

Para la observación de los espermatozoides con la membrana dañada se utilizó la tinción E-N, con la que aparecieron teñidos de rojo o rosa aquellos

espermatozoides con membrana dañada, e intactos aquellos espermatozoides que aparecieron sin teñir. Esto es debido a que el colorante es capaz de atravesar y colorear aquellos espermatozoides con la membrana celular dañada, así como de no teñir aquellos que posean la membrana celular intacta, y por tanto, no dejar paso al colorante a su interior (Pérez y Pérez, 1985; Gloria, 2012). Para ello se hicieron frotis y se observaron en microscopio óptico de campo claro (*Leica, DM-2000*) a 40 X. Se contabilizaron un total de 300 células espermáticas de cada preparación, englobando las células espermáticas dañadas y no dañadas.

3.4. Métodos de dilución y conservación del semen de toro ML

3.4.1. Diluyentes

Para la realización de la congelación de las células espermáticas bovinas se usó el diluyente utilizado según el protocolo de Watson (1976) y del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1985) mediante el empleo del diluyente Tris, preparado a partir de las diluciones referidas en las **tablas 5 y 6**. Las diluciones se prepararon a una temperatura de 20°C, ajustándose el pH de cada una de ellas (pH= 6'75 para la dilución I y pH= 6'85 para la dilución II) mediante potenciómetro *Crison*. Las diluciones fueron filtradas con filtro de diámetro de poro 240 mm para eliminar los posibles restos derivados de la yema de huevo utilizada en su composición. Estas diluciones se mantuvieron a 4°C hasta una semana.

Tabla 5. Preparación de la dilución base.

TRIS	36'05 g
Ácido cítrico	20'24 g
Fructosa	14'88 g
Penicilina G sódica	1.000.000 UI
Sulfato dihidro-estreptomicina	1 g
H ₂ O bidestilada	1.000 ml

Tabla 6. Preparación de las diluciones I y II.

Dilución I (pH=6'75)		Dilución II (pH=6'85)	
Cantidad total (ml)	1.000	Cantidad total (ml)	1.000
Dilución base	672	Dilución base	672
H ₂ O destilada	128	Glicerina	128
Yema de huevo	200	Yema de huevo	200

Para el mantenimiento y dilución de los espermatozoides tras la descongelación se utilizó el medio *Tyrode* (Rigby *et al.*, 2001), cuya composición se detalla en la **tabla 7**.

Tabla 7. Composición del medio *Tyrode* (Rigby *et al.*, 2001).

Compuesto	Concentración (g/l)
NaCl	8'00
KCl	0'20
CaCl ₂	0'20
MgCl ₂	0'10
NaH ₂ PO ₄	0'05
NaHCO ₃	1'00
Glucosa	1'00

3.4.2. Crioprotectores

Para el presente estudio se utilizó el glicerol como CP celular en la congelación espermática, ajustando su concentración al 12'8% sobre la dilución II. Como la unión de la dilución I más el semen y la dilución II se hace a partes iguales y la primera no lleva glicerol, la concentración final del glicerol queda al 6'4%.

3.4.3. Concentración espermática de dosis seminales

La concentración de espermatozoides se ajustó a 80×10^6 esp totales/ml, de los cuales al menos el 30% deben presentar motilidad progresiva después de efectuado todo el proceso. Por todo lo cual, cada dosis seminal de 0'5 ml de volumen contendrá 40×10^6 esp totales.

Para el cálculo de las dosis a preparar según el volumen de eyaculado, el primero de los pasos seguidos fue conocer el volumen de semen obtenido mediante un tubo de vidrio graduado, y la concentración espermática mediante fotómetro; el nº de espermatozoides totales obtenidos se disminuye en un 10% para compensar los que se pierden a lo largo del proceso (restos que quedan en el material de vidrio, etc.). Seguidamente, se dividió el nº total de espermatozoides obtenidos por 40×10^6 (nº mínimo recomendado de esp/dosis). La fórmula válida para este cálculo es:

$$N^{\circ} \text{ de dosis} = ((\text{Volumen} \times \text{Concentración}) - 10\%) / 40 \times 10^6$$

Para el cálculo del volumen final del conjunto de diluyentes más el semen se procedió de la siguiente forma: el diluyente final, expresado en ml, es el nº de dosis multiplicado por 0'5 ml que contiene cada pajuela. Este volumen final se consiguió agregando al semen las diluciones I y II, siguiendo las pautas que a continuación se detallan, teniendo en cuenta que el volumen de dilución I más el semen deberá ser igual al volumen de la dilución II:

- *Dilución I*: en primer lugar, añadir al semen la cantidad equivalente al volumen de semen obtenido; a los 15 min agregar la mitad de la dilución I, y por último, completar a los 10-15 min con el resto de la dilución I calculada.

- *Dilución II o glicerolización*: pasados 10 min, añadir al conjunto anterior una quinta parte de la dilución II repitiendo esta operación cada 10 min, 5 veces. De esta forma se consigue un suave aumento gradual de la presión osmótica.

El semen procesado fue homogeneizado tras cada adición de diluyente I y II para asegurar la distribución correcta de elementos nutritivos y crioprotectores.

3.4.4. Identificación de envases seminales (pajuelas)

Previamente, todos los envases seminales que iban a contener los espermatozoides fueron identificados con la fecha de congelación seminal y las siglas identificativas del toro ML al cual pertenecía el semen. Además de esto, en todas las pajuelas utilizadas para la congelación se grabaron los otros datos establecidos en el R.D. 841/2011, por el que es de obligado cumplimiento que en el envase de todas las dosis seminales bovinas estén claramente legibles los siguientes caracteres numéricos y alfanuméricos:

N (*Fecha congelación*) ***BMU*** (*código identificativo del toro*) ***ES-13-RS-01-B***

Donde ***N*** (se refiere a que el semen contenido en la pajuela pertenece a una raza en peligro de extinción y que ese material genético puede ser utilizado para fines científicos o experimentales); ***BMU*** (Bovino Murciano Levantino); ***ES-13*** (provincia donde se autoriza el centro y/o equipo, en este caso, Murcia); ***RS*** (actividad referida a la recogida de semen); ***01*** (dígitos que se asignan de forma correlativa al centro de recogida, según el orden de registro confeccionado al efecto en la Comunidad Autónoma) y ***B*** (código que se refiere a la especie con la que se está trabajando, en este caso “Bovina”). Esto es así para el semen recogido y utilizado después del año 2011, fecha de publicación del R.D. El semen recogido con anterioridad a esa fecha fue identificado con la fecha de recogida, el código de la raza a la que pertenece (ML) y el nº correlativo otorgado al donante por el IMIDA.

3.4.5. Sistema de envasado seminal

Las dosis seminales fueron envasadas en pajuelas de 0'5 ml mediante sistema semi-automático de envasado y sellado con bolas de acero (*Minitübe*, Alemania).

3.4.6. Curva de temperatura

El día de la recogida seminal, las diluciones I y II, además de todo el material utilizado, se mantuvieron a 20°C. Una vez obtenido el eyaculado a partir de los métodos mencionados anteriormente, y una vez añadidos los diluyentes I y II según el protocolo, se redujo la temperatura de 20°C a 5°C en 30 min (velocidad: -0'5°C/min). Operación que se consiguió mediante la adición de hielo. Una vez alcanzados los 5°C, se realizó un examen rápido de la vitalidad de los espermatozoides mediante observación por microscopía óptica. A continuación, el semen se pasó a una cámara de refrigeración a 5°C, en la que se mantuvo equilibrado durante 4 a 6 h. La operación de envasado y sellado de las pajuelas se realizó en la misma cámara de refrigeración a 5°C. Tras la operación de envasado y sellado de las pajuelas, éstas se colocaron en estantes metálicos de congelación y se congelaron en un biocongelador programable "*Computer Controlled Rate Freezer 14S SY-LAB. Icecube*" (*Minitübe*, Alemania).

La congelación espermática se realizó con la curva de temperatura cuyas pautas se relacionan a continuación: Temperatura de inicio 4°C. Primera rampa de 4°C hasta -6°C a -1°C/min, en 10 min; mantenimiento a -6°C durante 1 min; de -6°C hasta -196°C a -47'50°C/min, en 4 min.

3.4.7. Almacenamiento de dosis seminales

Una vez realizada la congelación de las dosis seminales en el biocongelador programable, las pajuelas se sumergieron en N₂L y fueron almacenadas en contenedores de N₂L a -196°C.

3.4.8. Descongelación

La descongelación de las pajuelas de 0'5 ml se realizó en agua a 56°C durante 12 seg (Thilmant, 1997). El contenido de cada una de las pajuelas descongeladas fue vertido y mantenido en tubos de ensayo atemperados en baño termostático a 37°C, conteniendo cada uno de ellos 1 ml de medio *Tyrode*

(**Tabla 7**). Esta solución fue preparada con H₂O bidestilada, el pH fue ajustado a 7.4 y almacenada en cámara frigorífica a 4°C como máximo una semana.

3.5. Experiencia 2. Valoración de la calidad del semen congelado y recongelado

Los parámetros del espermiograma de semen de toro ML descongelado estudiados fueron los siguientes:

3.5.1. Porcentaje de espermatozoides vivos y motilidad individual

Estos dos parámetros fueron valorados tal y como se describe en el apartado 3.3.4.1, diluyendo en medio *Tyrode* en una relación semen:diluyente de 1:2. Normalmente, el semen congelado de toro está demasiado concentrado como para poder determinar estos parámetros de la dosis seminal sin tener que diluir el semen (Vera, 2003). La existencia de un movimiento progresivo lineal en el espermatozoide es la característica fundamental de la que nos ha de informar la motilidad individual, dato de vital importancia, ya que la fertilidad y el nº de espermatozoides móviles inseminados están notoriamente relacionados (Bearden y Fuquay, 1982).

3.5.2. Test de resistencia espermática

Para conocer la capacidad de supervivencia que tendrían los espermatozoides en el tracto de la hembra, se descongeló una pajuela de 0.5 ml en agua a 56°C durante 12 seg. El contenido de la misma se introdujo en un tubo de vidrio atemperado en baño termostático a 37°C conteniendo éste 1 ml de solución *Tyrode*. La motilidad individual y el porcentaje de espermatozoides vivos a lo largo del tiempo fueron los dos parámetros que se midieron de forma subjetiva, tal y como se describe en el apartado 3.3.4.1. Este proceso se repitió cada hora y en cada dosis seminal descongelada de los toros utilizados en este estudio hasta que la calidad de ambos parámetros fue despreciable.

3.5.3. Estudio del acrosoma

La integridad de la membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática, por eso es importante el estudio de las mismas. Para la evaluación de la reacción acrosómica en espermatozoides congelados y recongelados se realizó la tinción con la lectina *Peanut agglutinin* (PNA) unida a fluoresceína (PNA-FITC) e ioduro de propidio (IP), procediendo del siguiente modo:

1) Descongelación de las pajuelas de 0'5 ml (56°C, 12 seg) en tubo *eppendorf* con 0'5 ml de medio *Tyrode* a 37°C en baño termostático.

2) Centrifugación (*Sigma*, 2-16K) a 825 x g, durante 5 min. El sobrenadante fue eliminado mediante aspiración con pipeta Pasteur de vidrio y el *pellet* resultante fue resuspendido en 1 ml de medio *Tyrode* previamente atemperado a 37°C.

3) Para el análisis de la muestra, se añadió a otro tubo *eppendorf* 100 µl de la suspensión espermática y se añadieron 5 µl de lectina PNA-FITC (200 µg/ml), 5 µl de IP (500 µg/ml), fijados con 10 µl de solución salina formolada 1%.

4) Incubación de la muestra a 38°C en baño termostático, 10 min.

5) Inmediatamente después, se dispensaron 35 µl de la solución en portaobjetos con cubreobjetos para la evaluación microscópica.

6) A continuación, las muestras teñidas fueron observadas en microscopio de epifluorescencia (*Optika B-600 TiFL*) con filtro azul (450-480 nm de longitud de onda de excitación) y filtro verde (510-550 nm de longitud de onda de excitación) clasificando 200 esp/muestra y realizando la clasificación atendiendo a los siguientes criterios según Gardón *et al.* (2001):

- Espermatozoides con ausencia de coloración: espermatozoides intactos.

- Espermatozoides con acrosoma color verde: acrosoma dañado y teñidos con PNA-FITC.

- Espermatozoides de color rojo por IP: espermatozoides con pérdida de integridad de membrana.

3.5.4. Estudio de la cromatina

El núcleo del espermatozoide de mamífero posee una cromatina estable y bastante compacta. Las alteraciones en la cromatina se han asociado a la baja fertilidad en varias especies, por lo que el estudio del estado de la cromatina es de gran interés (Carretero *et al.*, 2009). Para la puesta a punto de la técnica con azul de toluidina se realizó el protocolo que se detalla a continuación:

1. Descongelación de las pajuelas de 0'5 ml (56°C, 12 seg). Descargando el contenido en un tubo *ependorf* con 0'5 ml de medio *Tyrode* atemperado a 37°C en baño termostático.

2. Centrifugación a 825 x *g*, 5 min. El sobrenadante se eliminó mediante aspiración con pipeta Pasteur de vidrio. El *pellet* resultante se resuspendió en 1 ml de medio *Tyrode* previamente atemperado a 37°C.

3. Se realizaron 3 extensiones por pajuela fijadas en solución etanol-ácido acético (3:1 v/v) durante 1 min y etanol al 70%, durante 3 min.

4. Hidrolización de cada extendido espermático en CIH 4N durante 25 min. Se lavó en H₂O bidestilada y se dejó secar al aire.

5. Para la realización de la tinción con azul de toluidina se añadió sobre el extendido espermático una gota de 30 µl de azul de toluidina (0'025% en buffer McIlvaine, pH 4) y finalmente se colocó un cubreobjetos para observar la preparación en microscopio óptico (Leica DM-2000) a 40 X.

Para la evaluación de la preparación (*Fig. 4*) se consideraron los siguientes criterios:

- Espermatozoides con cromatina normal: aquellos que se tiñeron de color azul claro.

- Espermatozoides con cromatina dañada: aquellos que presentaron un color azul oscuro o violeta, una apariencia granular fina, menor elipticidad y cabeza más redondeada y ancha.



Figura 4. Tinción de espermatozoides de toro ML con azul de toluidina (40 X).

3.5.5. Estudio de morfoanomalías espermáticas

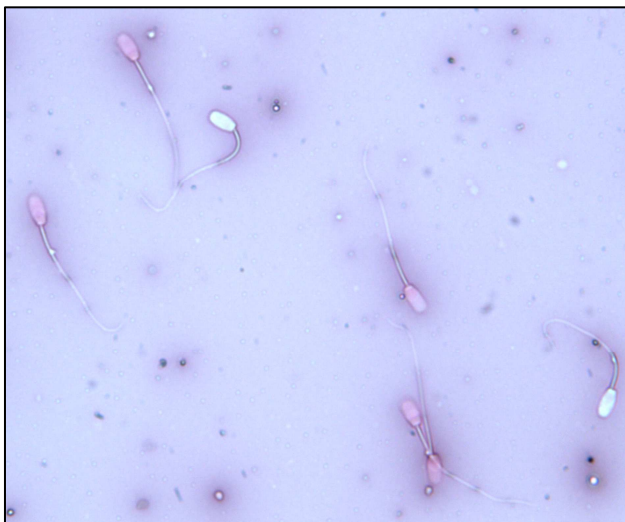


Figura 5. Tinción E-N en espermatozoides de toro ML (40 X).

La tinción E-N (*Fig. 5*) es ideal para evaluar la morfología espermática dado que, al no existir pasos de lavado, todo lo que está en el semen se revela en el frotis (Catena y Cabodevila, 1999). La tinción E-N fue aplicada en cada una de las dosis seminales descongeladas para conocer el estado de la membrana plasmática según se ha descrito con anterioridad.

El porcentaje de formas anormales fue medido sobre las mismas tinciones de E-N realizadas a cada uno de los toros estudiados. Se evaluaron un total de 200 esp/muestra de semen congelado y recongelado CT y ST. La determinación de las formas anormales se hizo en microscopio óptico de

campo claro (*Leica DM-2000*) a 40 X. Se observaron las siguientes morfoanomalías espermáticas:

- Cabezas sueltas.
- Espermatozoides con cabezas anormalmente pequeñas (microcabezas).
- Espermatozoides con cabeza redonda.
- Cabezas dobladas.
- Cabezas dobles.
- Colas sueltas (ausencia de cabeza).
- Colas dobladas (flagelo truncado).
- Colas en ovillo.
- Presencia de gota proximal.

3.5.6. Métodos de recongelación de semen descongelado

Una vez valorado el semen descongelado, se procedió a su recongelación después de haber sido sometido a dos procedimientos diferentes que simulaban diversa incidencia de agresión sobre la célula descongelada.

Previamente, el envasado de las pajuelas de 0'5 ml en la recongelación espermática se realizó sellando las pajuelas con alcohol de polivinilo en polvo de forma manual, dado el bajo nº de pajuelas a envasar, y por tanto, la baja cantidad de diluyente más semen a procesar.

3.5.6.1. Agresión seminal máxima (semen recongelado con tratamiento previo - CT).

Se descongelaron 20 pajuelas de 0'5 ml, 5 pajuelas para cada uno de los 4 replicados. El contenido de cada pajuela, una vez descongelada, se introdujo en un tubo de ensayo con 5 ml de medio *Tyrode* atemperado a 37°C. La descongelación de las pajuelas se llevó a cabo en baño termostático (56°C, 12 seg). Cada tubo se mantuvo atemperado en baño termostático a 37°C, 15 min. Los tubos fueron sometidos a una primera centrifugación (100 x g, 5 min),

eliminandose el *pellet* y conservando el sobrenadante. A continuación, se realizó una segunda centrifugación (800 x g, 10 min), rescatando el *pellet* y eliminando el sobrenadante en este caso.

Los cuatro *pellets* obtenidos se unieron en dos, a partir de los cuales se volvió a realizar el proceso de congelación especificado en el protocolo de Watson (1976), siguiendo los cálculos correspondientes para obtener doce pajuelas de 0.5 ml con una concentración de 40×10^6 esp en cada una de ellas. El llenado de las pajuelas se realizó de forma manual por aspiración con jeringuilla de insulina, sellándose éstas con alcohol de polivinilo por no haber suficiente volumen para utilizar la envasadora semiautomática. Las pajuelas se introdujeron en cámara frigorífica a 4°C durante 4 h.

Tras el tiempo estipulado se procedió a la congelación de las muestras CT mediante biocongelador programable y utilizando el mismo programa empleado en la congelación del semen inicial. Las muestras fueron almacenadas en contenedores de N₂L a -196°C.

3.5.6.2. Agresión seminal mínima (semen recongelado sin tratamiento previo - ST)

Para la obtención de las pajuelas “recongeladas ST”, se descongelaron a 56°C, 12 seg igual nº de pajuelas descongeladas que para la recongelación CT y se mantuvieron a 20°C durante 30 min, y a 4°C otros 30 min.

3.5.7. Valoración del eyaculado bovino post-recongelación

Para la valoración de la calidad del semen recongelado se realizaron los mismos estudios y procedimientos que para el semen congelado; es decir, valoración de la motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos, así como un test de resistencia mediante motilidad espermática, estudio del estado del acrosoma mediante el uso de IP y lectinas PNA, y evaluación del estado de la cromatina mediante el empleo de la coloración del azul de toluidina.

3.6. *Experiencia 3. Uso de la IA para la valoración de la fertilidad del semen recongelado*

El mejor método para determinar la capacidad fecundante de una dosis de semen y comprobar si el protocolo de recongelación espermática funciona, es la IA de un gran nº de vacas (Amann, 1989). Sin embargo, debido a que el semen utilizado para este estudio (ML3) proviene de una raza en peligro de extinción, y de un ejemplar ya fallecido de gran valor genético, no se pudo disponer de un elevado nº de dosis seminales y por tanto, de un nº mayor de hembras para la realización del ensayo.

Se realizó la IA a 7 novillas de 15 meses de edad de raza Frisona, situadas en una explotación ubicada en Los Dolores (Murcia). En primer lugar, se realizó la sincronización e inducción a la ovulación de las hembras de estudio mediante la aplicación de un dispositivo intravaginal impregnado en progesterona (*CIDR[®]*, Zoetis, Francia). Una semana después se aplicó una dosis de PGF2 α (*Dinoprost*; *Dinolytic[®]*, Zoetis, Francia), y un día más tarde se retiraron los dispositivos intravaginales. Transcurridas 48 h, las hembras fueron inseminadas dos veces (intervalo de 12 h) mediante catéter de IA para bovino (*QuickLock Classic*, *Minitübe*, Alemania) con semen procedente de la recongelación ST del toro ML3.

La IA se realizó inmovilizando a las novillas con la ayuda de vallas tipo atrapador situadas en la misma explotación. Las dosis seminales fueron transportadas a la explotación donde se encontraban las novillas que se utilizaron para el estudio en un contenedor de N₂L, y sólo se descongelaron las pajuelas que se iban a utilizar en ese momento para no mermar la calidad del resto de dosis. El proceso de descongelación se realizó a 37°C en 1 min. Las pajuelas, tras ser cortadas por uno de los extremos, fueron introducidas en el catéter de IA, insertando a continuación una vaina universal de IA.

Tras el vaciado del recto de las heces utilizando un guante de inseminación y la limpieza de la vulva con agua y papel, se introdujo el catéter en la vagina, conteniendo ya en su interior la dosis seminal; la otra mano se

introdujo en el recto para guiar el catéter a través de cuello uterino para depositar en el cuerpo del útero el contenido seminal de la pajuela. Cada novilla fue inseminada con 40×10^6 esp/pajuela de 0'5 ml.

Para comprobar la efectividad de la IA, se realizó el diagnóstico de gestación a los 45 y 60 días mediante ultrasonografía transrectal con ecógrafo *IMAGO* (ECM, Francia) dotado de sonda lineal de 5-7'5 Mhz. Para ello, todas las novillas inseminadas volvieron a ser inmovilizadas; el recto de las hembras fue vaciado de heces. Con la ayuda de un guante previamente lubricado, se introdujo la mano por el recto acompañada del transductor del ecógrafo. Una vez localizado el útero, se realizaron movimientos lentos de la sonda ecográfica para su correcta visualización. Aquellas hembras a las que se les identificó vesícula embrionaria y presencia del embrión fueron calificadas como gestantes.

3.7. Diseño experimental

3.7.1. Experiencia 1. Parámetros seminales en toros de raza ML

3.7.1.1. Determinación del color, olor, volumen y pH

El objetivo de este análisis fue el de averiguar si existían diferencias en relación al color, olor y pH de los eyaculados que se pudieran establecer como característicos de la raza ML. La medición del color se obtuvo mediante valoración visual subjetiva y el pH mediante tiras de papel indicador.

Con el fin de determinar el volumen promedio de semen eyaculado por seminal de la raza ML, e incluso poder determinar este promedio para el primer y segundo eyaculado pudiendo establecer diferencias entre estos, se realizó la extracción seminal a 12 toros de la raza ML mediante electroeyaculación. El semen fue colectado en un tubo graduado, tal y como se describe en la metodología.

3.7.1.2. Determinación de concentración espermática

Con el objetivo de implementar un promedio de concentración espermática de los eyaculados de toro ML, e incluso establecer diferencias entre las concentraciones existentes entre el primer y el segundo eyaculado, se emplearon 12 toros de la raza ML a los que se les extrajo semen mediante la electroeyaculación. Las medidas de concentración espermática se realizaron mediante fotómetro.

3.7.1.3. Determinación de dosis totales y por eyaculado

En base a los valores promedio de volumen y concentración se determinó el nº promedio de dosis seminales obtenidas en el primer y segundo eyaculado, así como el nº promedio de dosis por eyaculado para cada uno de los 12 toros ML utilizados en el estudio.

3.7.2. Experiencia 2. Recongelación espermática CT y ST. Valoración de la calidad espermática del semen congelado y recongelado

3.7.2.1. Recongelación espermática CT

Para la realización de este experimento, se descongelaron (56°C, 12 seg) un total de 5 pajuelas de 0'5 ml por toro ML (ML2, ML3, ML5, ML8, ML9 y ML11), El semen descongelado fue sometido a dos procesos de centrifugación ya descritos con anterioridad, y vuelto a congelar por segunda vez, con la finalidad de analizar el comportamiento de los espermatozoides tras agredir a las células espermáticas. Esta metodología se repitió cuatro veces por cada donante.

3.7.2.2. Recongelación espermática ST

Un total de 5 pajuelas (de 0'5 ml cada una) por toro de la raza ML que se utilizaron para la recongelación espermática (ML2, ML3, ML5, ML8, ML9 y ML11) fueron descongeladas de igual modo al descrito en el apartado anterior (3.7.2.1) y sometidas a 20°C durante 30 min y a 4°C otros 30 min, antes de ser

nuevamente congeladas (sin la apertura de las pajuelas), con la finalidad de someter al semen a un proceso de congelación doble sin haber experimentado manipulación alguna (recongelación espermática ST). Esta metodología se repitió cuatro veces para cada semental.

3.7.2.3. Porcentaje de espermatozoides vivos y motilidad individual

Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen congelado y recongelado (CT y ST) de toro ML, promedio y comparación entre sementales con respecto a este parámetro, el semen es descongelado y valorado utilizando una escala subjetiva de 0 a 100, repitiendo este proceso cuatro veces para cada uno de los sementales incluidos en este ensayo. Con esta medida también se hicieron comparaciones entre donantes (tras obtener los valores promedio procedentes de las cuatro repeticiones), y entre el primer y segundo eyaculado dentro de un mismo semental. Se realizaron comparaciones entre los individuos objeto del estudio.

Con el objetivo de conocer el valor promedio de la motilidad individual en el semen congelado, recongelado CT y recongelado ST de toro ML, además de averiguar si existen diferencias entre los diferentes sementales estudiados para este parámetro, se valoró el semen descongelado de forma subjetiva utilizando una escala de 0 a 5, realizando cuatro repeticiones para cada uno de los toros sometidos a estudio y obteniendo de éstas un valor promedio para cada donante. Este parámetro se utilizó para hacer comparaciones entre sementales, y entre primer y segundo eyaculado dentro de un mismo individuo.

3.7.2.4. Test de resistencia espermática

Con la finalidad de analizar el tiempo de resistencia de los espermatozoides congelados y recongelados (CT y ST) como medida adicional de calidad espermática y que simularía las condiciones naturales ante una IA o monta natural, los espermatozoides se expusieron a 37°C mientras permanecieron en un medio nutritivo, los cuales fueron evaluados tomando como medidas estándar la motilidad individual y el porcentaje de

espermatozoides vivos a cada hora de forma subjetiva. Esta experiencia se desarrolló hasta en cuatro ocasiones para cada uno de los seis sementales utilizados obteniendo un valor promedio de las repeticiones para cada uno de los sementales y comparando a continuación los resultados de cada semental.

3.7.2.5. Integridad de membrana

Para conocer el estado de la membrana espermática, y por tanto, si se encontraba dañada, se utilizaron dos técnicas, como son la tinción E-N y la tinción fluorescente con IP. Se realizaron, además, comparaciones entre los diferentes ejemplares ML estudiados y entre las diferentes técnicas de congelación, realizando cuatro repeticiones para cada toro ML.

3.7.2.6. Estudio del acrosoma

Para conocer el correcto estado del acrosoma de los espermatozoides en el semen congelado y recongelado (CT y ST) de toro ML, de vital importancia en el proceso de la fecundación, se realizó la tinción con lectina *PNA*, procediendo según el protocolo ya explicado con anterioridad. Se descongelaron y analizaron un total de 4 pajuelas perteneciente a cada uno de los 6 toros ML usados en esta experiencia.

3.7.2.7. Estudio de la cromatina

Con el objetivo de analizar el estado de la cromatina (ADN) de la célula espermática asociado con problemas de fertilidad, se realizó la tinción de azul de toluidina mediante la metodología detallada con anterioridad. Para ello, se descongelaron y analizaron un total de 4 pajuelas pertenecientes a ambos tipos de semen (CT y ST) de cada uno de los 6 toros ML usados en el estudio.

3.7.2.8. Estudio de morfoanomalías espermáticas

Con la finalidad de conocer el porcentaje total de anomalías morfológicas presentes en los espermatozoides del semen congelado y recongelado (CT y

ST) de toro ML, y poder así, comparar entre los métodos de congelación y entre sementales, se analizaron para esta experiencia 4 réplicas para cada toro, a las que se les aplicó la tinción E-N, sobre la que se pudieron visualizar las morfoanomalías existentes, contabilizando un total de 200 esp/muestra y siguiendo los criterios ya mencionados con anterioridad.

3.7.3. Experiencia 3. Uso de la IA para la valoración de la fertilidad del semen recongelado

El objetivo de esta experiencia fue el de utilizar la IA como herramienta adicional y predictora de la calidad y capacidad fecundante del semen recongelado. Para ello, se procedió a la IA, previo tratamiento de inducción y sincronización de las novillas mediante CIDR y con la metodología explicada con anterioridad, de un total de 7 novillas de raza Frisona con el semen proveniente del toro que mejores resultados espermáticos obtuvo y que fue sometido previamente a un proceso de descongelación y recongelación espermática sin la realización de tratamiento alguno (ST). El diagnóstico de gestación se realizó a los 45 y los 60 días mediante ultrasonografía transrectal.

3.8. Análisis estadístico

Todas las variables que fueron analizadas aportaron información sobre el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. El análisis estadístico se realizó mediante el programa informático *Excel 2003* y el software *Statgraphics plus v. 2.1*. Los datos fueron tratados estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA).

En las variables en las que se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) se utilizó el Test de Turkey HSD (*Honest Significant Difference*), para determinar la existencia de diferencias entre las medias, estableciéndose un nivel de confianza del 95%.

El error estándar no se encuentra entre las variables estadísticas estudiadas en la presente tesis, ya que el tamaño de la muestra sometida a

estudio (6 toros ML) es demasiado pequeña, por lo que esta variable presentaba valores elevados y no aportaba información adicional.

Para los parámetros estadísticos: volumen y concentración se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Para el nº de dosis seminales preparadas de los toros ML en el 1º y 2º eyaculado y el nº de dosis por eyaculado, se calculó la media ponderada, así como la desviación típica y el coeficiente de variación.

Para las variables motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos (3.7.2.3 y 3.7.2.4) se realizaron, además, comparaciones con los métodos de congelación y recongelación utilizados.

Los tests de resistencia espermática, tanto para la variable “motilidad individual” como “porcentaje de espermatozoides vivos”, fueron estudiados estadísticamente comparando todos los sementales ML utilizados, así como por “tiempo de resistencia” de la célula espermática. Las mismas comparaciones se realizan para el estudio de la integridad de la membrana plasmática (E-N e IP) y ADN espermático (azul de toluidina).

Las morfoanomalías espermáticas se analizaron separando tipos de anomalías encontradas en los espermatozoides y comparando entre congelaciones y recongelaciones, así como de los valores promedio.

4. RESULTADOS

4.1. Experiencia 1. Parámetros seminales en toros de raza ML

4.1.1. Color y pH

El color de los eyaculados obtenidos fue apreciado de forma subjetiva para ver si se presentaba alguna coloración diferente al blanco lechoso característico de la especie bovina, no apreciándose ninguna diferencia entre eyaculados. No obstante, cuando éstos presentaron una mayor concentración espermática se observó una coloración tendente al blanco cremoso, mientras que los que contenían menor número de espermatozoides mostraron un aspecto más tendente a la transparencia. En este caso, el semen de los toros más adultos tiene un color blanquecino más homogéneo que los donantes más jóvenes. El pH del semen de los eyaculados de esta raza está cercano a la neutralidad ($\text{pH}=7$) con valores que oscilan entre 6'9 y 7'5, siendo el rango más frecuente de 7'2-7'5.

4.1.2. Volumen seminal

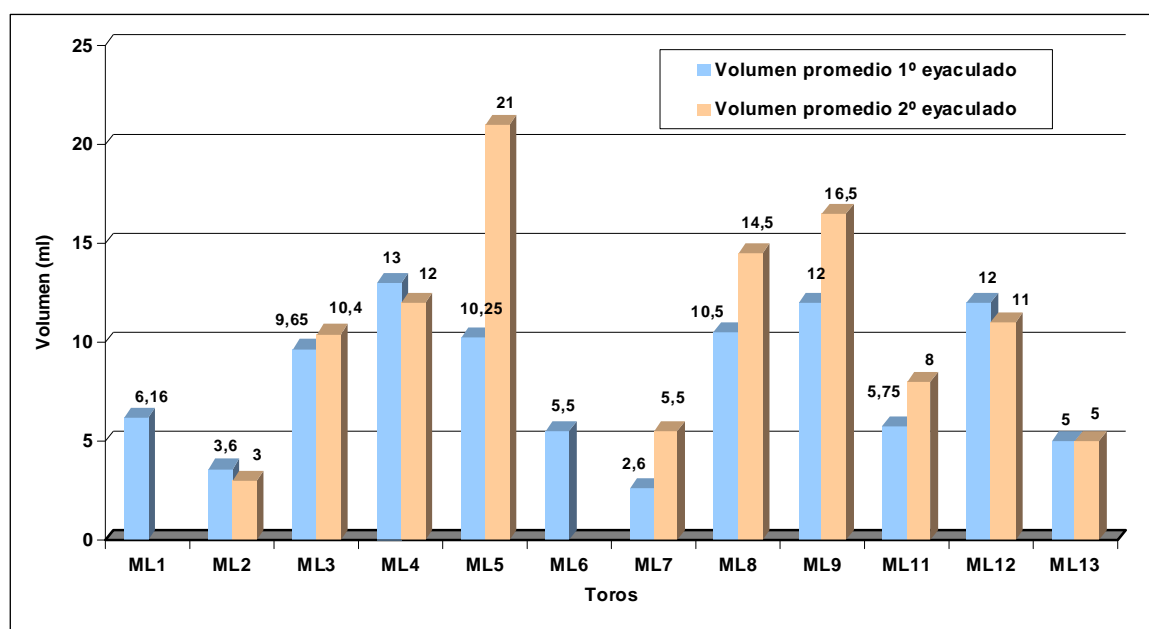


Figura 6. Valores promedio del volumen de eyaculado en toros ML.

El valor promedio de volumen de los eyaculados de toros ML ha sido de 8 ml (n=48) para los eyaculados extraídos en 1º lugar. El 2º eyaculado extraído en el mismo proceso, tuvo un valor promedio de 10'69 ml (n=34) (Fig. 6). No se hallaron diferencias significativas entre el 1º y 2º eyaculado, con un nivel de confianza de 95% para este parámetro.

4.1.3. Concentración espermática

Los valores promedio de la concentración espermática de los toros ML se muestra en la fig. 7, con una concentración promedio de $591'4 \times 10^6$ esp/ml (n=45) para el 1º de los eyaculados obtenidos en la sesión de extracción, y de $507'3 \times 10^6$ esp/ml (n=30) en el 2º de los eyaculados. No se hallaron diferencias significativas en los valores de concentración espermática entre 1º y 2º eyaculado ($p>0'5$).

El promedio de espermatozoides totales producidos en el 1º y 2º eyaculado es de 4731 y 5423 $\times 10^6$ esp/ml, respectivamente.

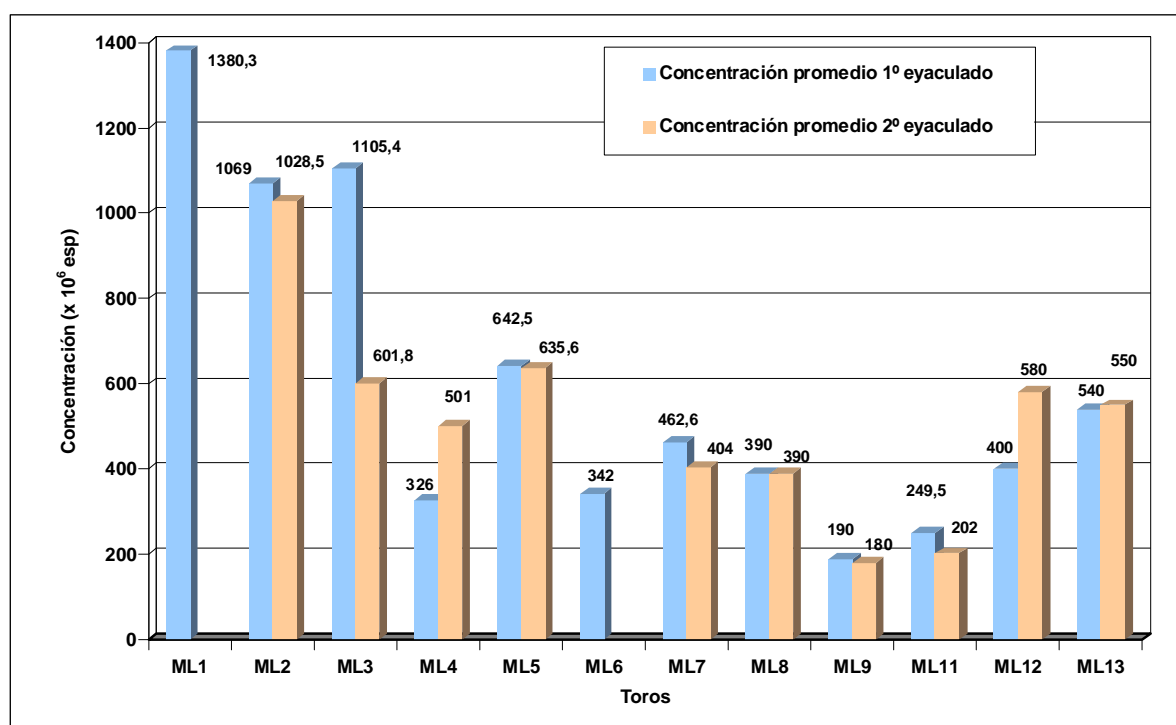


Figura 7. Valores promedio de concentración espermática en toros ML.

A la vista de las *figs.* 6 y 7 y comparando estos valores con las edades de los toros ML utilizados en el estudio, podemos decir que ni el volumen ni la concentración espermática están directamente relacionados con la edad del semental, sino que estas variables son dependientes del individuo.

Los valores promedio de concentración y volumen espermático de cada toro están muy relacionados entre los dos eyaculados obtenidos, con excepción de tres toros (ML5, ML8 y ML9) donde los valores promedio del volumen son mayores en el 2º eyaculado que en el 1º. Podría pensarse que es una respuesta de las glándulas genitales al electroeyaculador, esperándose que se acompañara de una disminución de la concentración para esos mismos toros. Como la concentración espermática es muy similar en cada uno de estos tres toros, es necesario pensar en una respuesta individual de cada toro con diferencias entre los eyaculados. Esta misma respuesta idiosincrásica puede atribuirse al toro ML3, donde hay un aumento de la concentración espermática del 1º eyaculado, mientras que el volumen es el mismo en ambos eyaculados.

4.1.4. Dosis seminales

Como se observa en la *fig.* 8, el número de dosis preparadas para cada uno de los toros ha sido muy variable, al menos para cuatro de los ejemplares (ML1, ML2, ML3 y ML5). Esto es debido a que pertenecían a criadores que en un principio los utilizaron para monta natural, después como donantes del Banco de Germoplasma, y una vez congeladas suficientes dosis seminales, fueron utilizados de forma discrecional por su propietario (monta natural, sacrificio, etc.). Con posterioridad, la Asociación optó por mantener los toros hasta los 2 años de edad (fecha en que alcanzan la categoría de adultos), realizar una o dos extracciones y a continuación enviar los ejemplares al matadero para su sacrificio. De esta forma se abarataba el coste del mantenimiento de los sementales.

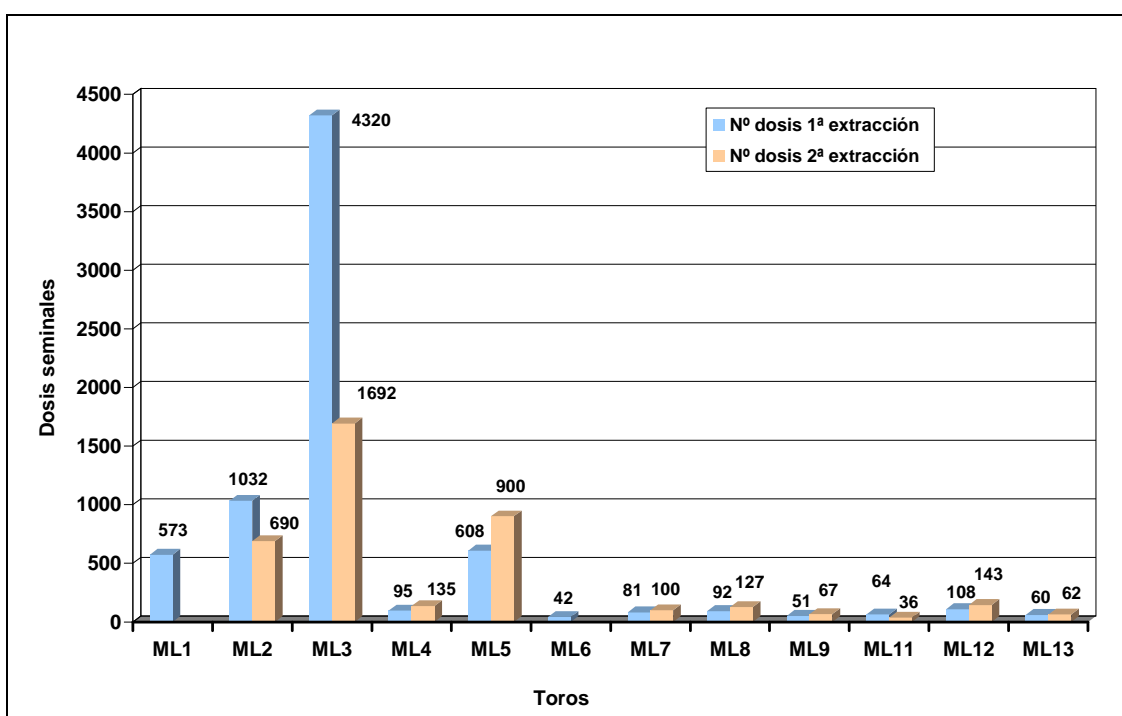


Figura 8. Número promedio de dosis seminales preparadas de toros ML.

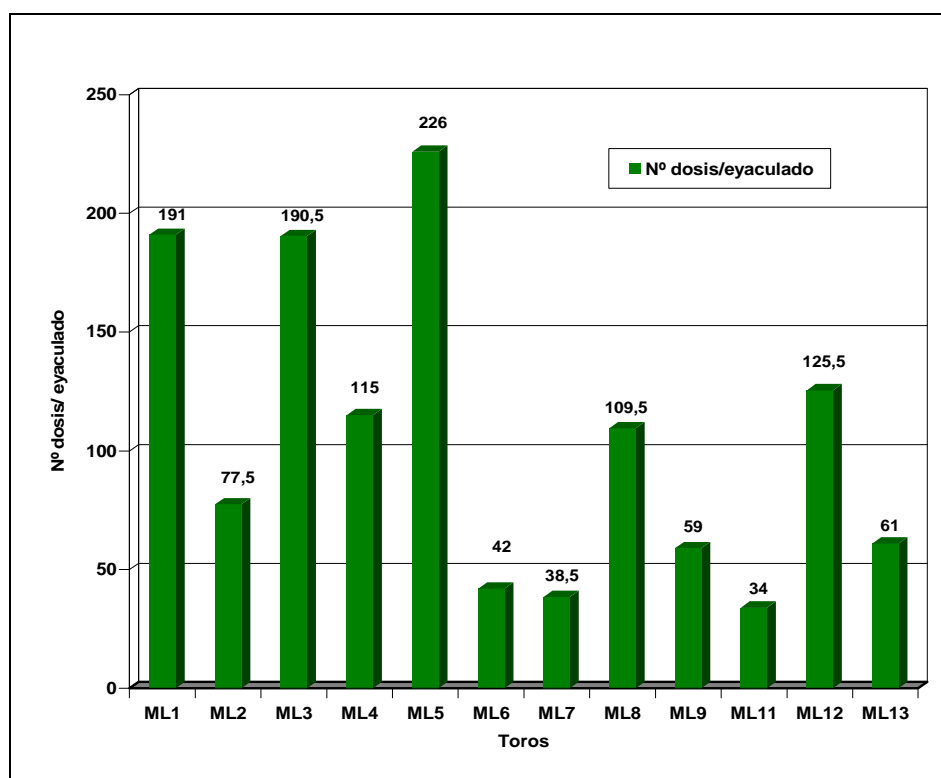


Figura 9. Valores promedio del número de dosis por eyaculado en toros ML.

Los datos estadísticos referentes a las *figs. 6 y 7*, se ven reflejados en la **tabla 8**, destacando que la concentración espermática procedente del 1º eyaculado ($591'44 \times 10^6$ esp/ml) es más elevada que la del 2º ($507'29 \times 10^6$ esp/ml), lo que resulta lógico, pues a mayor volumen, menor concentración, y viceversa. Con la excepción de las características individuales comentadas anteriormente.

De los datos de la *fig. 8*, se extrae que la media ponderada (X_p) de las dosis seminales en la 1ª extracción seminal fue de 148, y de 119 para la 2ª.

A partir de los datos de la *fig. 9*, se obtiene que la media ponderada (X_p) del número de dosis seminales por eyaculado es de 136.

El número total de dosis seminales en el Banco de Germoplasma a finales del primer semestre de 2014 es de 7280. Del total de dosis seminales, no todas han sido almacenadas en el Banco de Germoplasma, puesto que parte de ellas se han destinado a estudios de calidad de semen, investigación, pruebas de FIV y cesión de dosis seminales para el Banco de Germoplasma del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) en Madrid.

Tabla 8. Valores promedio de volumen y concentración espermática en 1º y 2º eyaculado de toros ML (n=12).

	V 1º (ml)	V 2º (ml)	[esp] 1º eyac ($\times 10^6$ esp/ml)	[esp] 2º eyac ($\times 10^6$ esp/ml)
Promedio	8	10'69	591'44	507'29
SD	3'61	5'59	384'28	242'43
CV (%)	45'12	52'33	54'97	47'79

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; v: volumen; [esp]: concentración espermática; eyac: eyaculado

4.2. Experiencia 2. Valoración de la calidad del semen congelado y recongelado

4.2.1. Motilidad individual del semen congelado y recongelado

Examinando la *fig. 10*, vemos que el valor promedio de motilidad individual de los espermatozoides descongelados, previamente recongelados sin ningún tipo de tratamiento (ST) entre el proceso de descongelación y recongelación, fue de 3'58 (escala subjetiva 0-5). Los valores promedio máximo y mínimo fueron de 4'12 y 2'75, respectivamente, lo que nos indica una diferencia notable entre los distintos sementales. Para los mismos toros, los valores promedio encontrados para este parámetro, pero utilizando un tratamiento (CT) entre los procesos de descongelación y recongelación fue de 2'93, siendo los valores máximo y mínimo de 3'87 y 1'37, respectivamente, indicando también grandes diferencias entre los sementales en este caso.

No existen diferencias significativas para cada donante en cuanto a la recongelación espermática (CT y ST) para este parámetro a un nivel de confianza del 95%, aunque es evidente que los valores de dos de los animales (ML2 y ML11) quedan muy alejados de los del resto.

Además, se observan para este parámetro valores muy superiores a los encontrados en los apartados anteriormente citados cuando se trata de espermatozoides no sometidos al proceso de recongelación, siendo el valor promedio de las dosis descongeladas de 4'08, con valores máximos y mínimos de 4'5 y 3, respectivamente. Estos valores indican que la célula espermática ha tenido un menor sufrimiento en el proceso de congelación, aumentándose las alteraciones a medida que el proceso de pérdida o ganancia de calor se repite o se produce un manejo celular, más o menos traumático, entre los procesos de congelación y recongelación. En este caso, las diferencias entre los respectivos ejemplares no son tan sustanciales como en los casos de los espermatozoides recongelados.

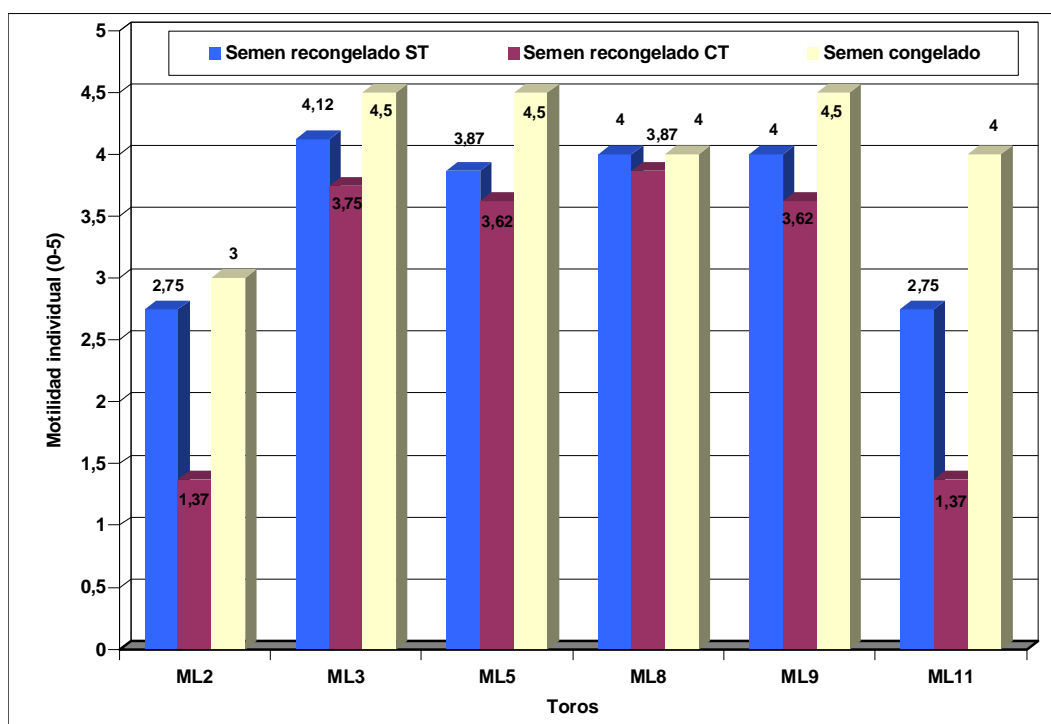


Figura 10. Motilidad individual en semen recongelado ST, recongelado CT y congelado en toros ML.

4.2.2. Porcentaje de espermatozoides vivos en semen congelado y recongelado

En la *fig. 11* se pueden observar los resultados obtenidos para los tres tipos de tratamientos de semen de los toros ML para el porcentaje de espermatozoides vivos tras descongelación. El valor promedio cuando se trató de dosis seminales recongeladas ST fue del 39'3%, siendo los valores máximo y mínimo de 56'25% y 15'75%, respectivamente. El valor promedio encontrado para las dosis seminales recongeladas CT fue de 21%, con unos valores máximos y mínimos de 50% y 4'75%, respectivamente. Lo que nos indican también diferencias acusadas entre los distintos sementales bovinos de la raza.

El valor promedio encontrado para espermatozoides descongelados sin sufrir una nueva congelación es del 60%, con unos valores máximos y mínimos de 65% y 50%, respectivamente. En este caso, se indican también valores

diferentes con los promedios de los otros dos procesos utilizados, excepto en el caso del semental ML3, en el que las diferencias entre procesos no son muy acusadas. No se encuentran diferencias evidentes entre los ejemplares utilizados.

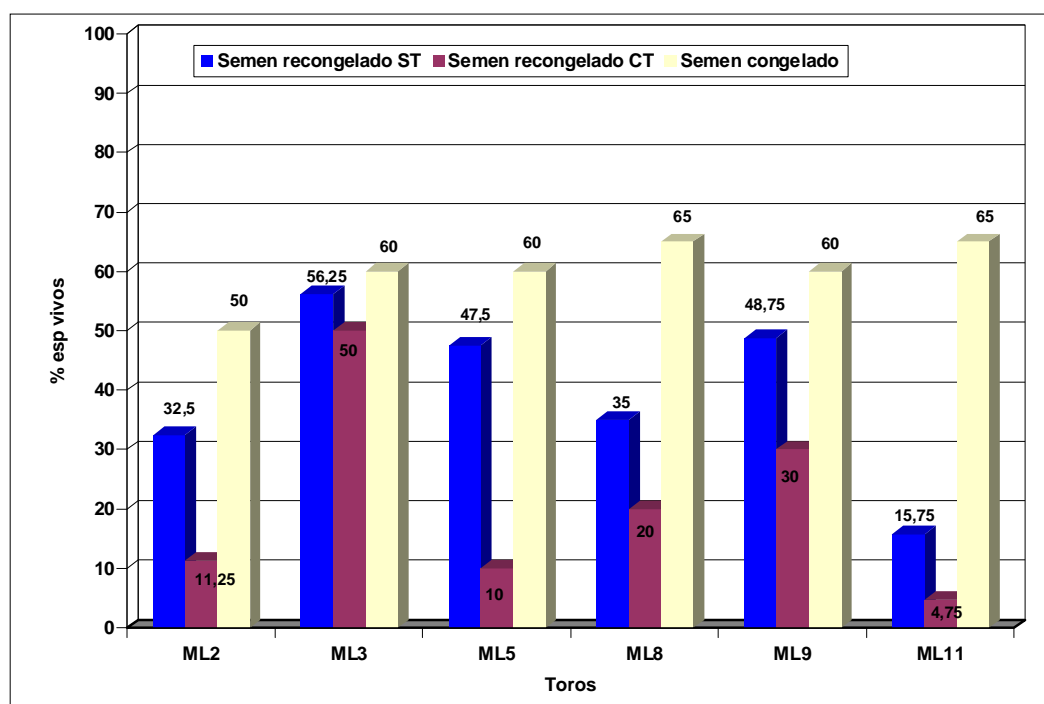


Figura 11. Porcentaje esp vivos en semen re congelado ST, re congelado CT y congelado en toros ML.

Del estudio de los valores promedio de estos parámetros podemos inferir que hay diferencias entre ejemplares cuando son sometidos a procesos de recongelación, mientras que estas diferencias no se observan cuando sólo se les ha aplicado un proceso de congelación seminal; aunque hay ejemplares que presentan mayor resistencia a la agresión sufrida tras la recongelación seminal (ML3). También se observan valores muy inferiores cuando existe algún tipo de manejo entre las fases de descongelación y recongelación.

Estas diferencias estudiadas estadísticamente presentan significación entre los resultados de congelación seminal y los de recongelación ST y recongelación CT ($p > 0,5$). Aunque no existen diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre los dos últimos métodos (**Tabla 9**).

Tabla 9. Valores promedio y estadísticos de los parámetros motilidad individual y porcentaje de esp vivos en semen congelado y recongelado.

	Motilidad individual (n=6)			% esp vivos (n=6)		
	ST	CT	C	ST	CT	C
Promedio	3'58	2'93	4'08	39'29	21	60
SD	0'65	1'21	0'58	14'58	16'75	5'48
CV (%)	18'12	41'39	14'30	37'11	79'76	9'12

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; ST: Recongelación espermática sin tratamiento previo; CT: Recongelación espermática con tratamiento previo; C: semen congelado; esp: espermatozoides. n: número de toros analizados.

4.2.3. Motilidad individual en test de resistencia espermática del semen congelado y recongelado

En la *fig. 12* podemos observar que los espermatozoides pertenecientes al toro ML3 fueron los que más tiempo permanecieron móviles (9 h), presentando una diferencia de 3 h con respecto a los espermatozoides de los dos toros que más tiempo presentaron motilidad tras él, es decir, ML8 y ML9, que llegaron a las 6 h. Por otra parte, ML2 y ML11 dejaron de mostrar motilidad a las 4 h y ML5, a las 5 h. Para este parámetro, se observa que ML3 y ML9 presentan valores promedio por encima de 3 en su motilidad individual pasadas 4 h y 30 min desde su descongelación y mantenimiento a 37°C, mientras que cuatro de los toros del ensayo no alcanzan esta resistencia al paso de ese tiempo. Observándose cierta debilidad en los ejemplares en cuanto a movimiento, y sobre todo, el cese de actividad flagelar. En la **tabla 10** se detallan los estadísticos con respecto al test de resistencia.

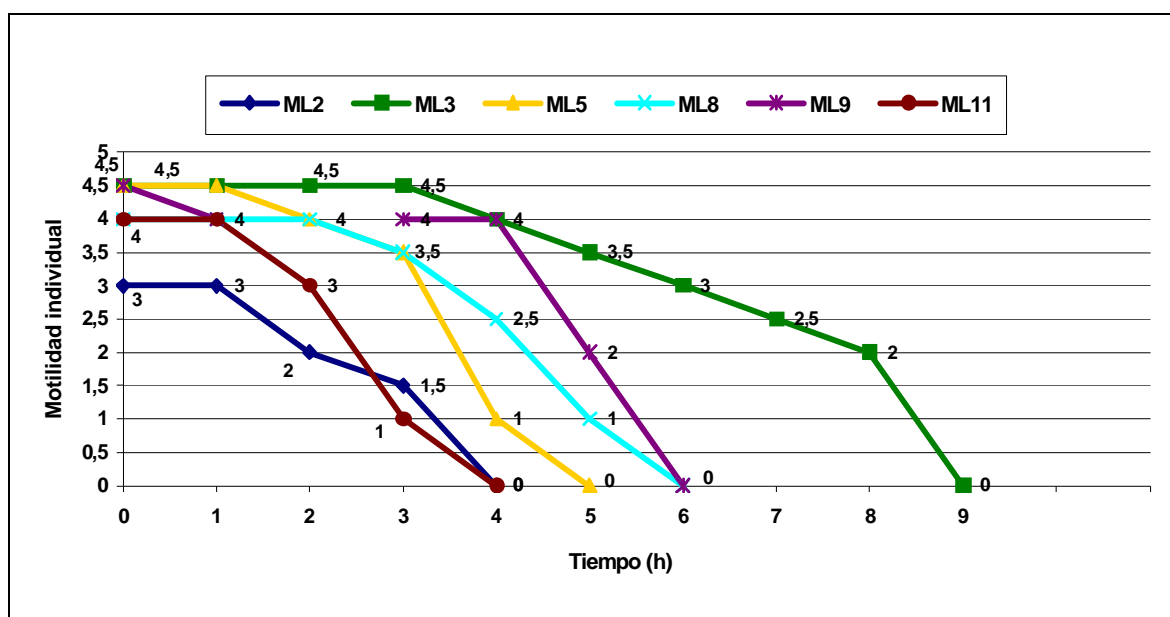


Figura 12. Motilidad individual de semen congelado de toros ML sometidos a test de resistencia térmica.

Tabla 10. Valores promedio y estadísticos en test de resistencia. Evolución de la motilidad individual del semen congelado (n=6).

(h)	0	1	2	3	4	5	6
Promedio	4'08	4	3'58	3	1'92	1'63	1
SD	0'58	0'55	0'92	1'41	1'85	1'49	1'73
CV (%)	14'21	13'69	25'41	47	96'85	88'27	173

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; h: horas.

En los valores presentados en la *fig. 13* para motilidad individual en el tiempo en semen recongelado ST, se determina que los espermatozoides de ML3 fueron los que más tiempo mantuvieron la motilidad (8 h), seguido de los toros ML2 (5 h), ML5, ML8 y ML9 (4 h) y por último, ML11 (3 h). Es de destacar que el toro que presenta menor promedio de motilidad individual es ML2, con valores muy bajos en el inicio. Los toros ML3 y ML9 son, de nuevo, los que aguantan más la actividad flagelar, más allá de las 3 h después de su descongelación. En la **tabla 11** se presentan los valores promedio y estadísticos en test de resistencia y la evolución de la motilidad individual del semen recongelado ST.

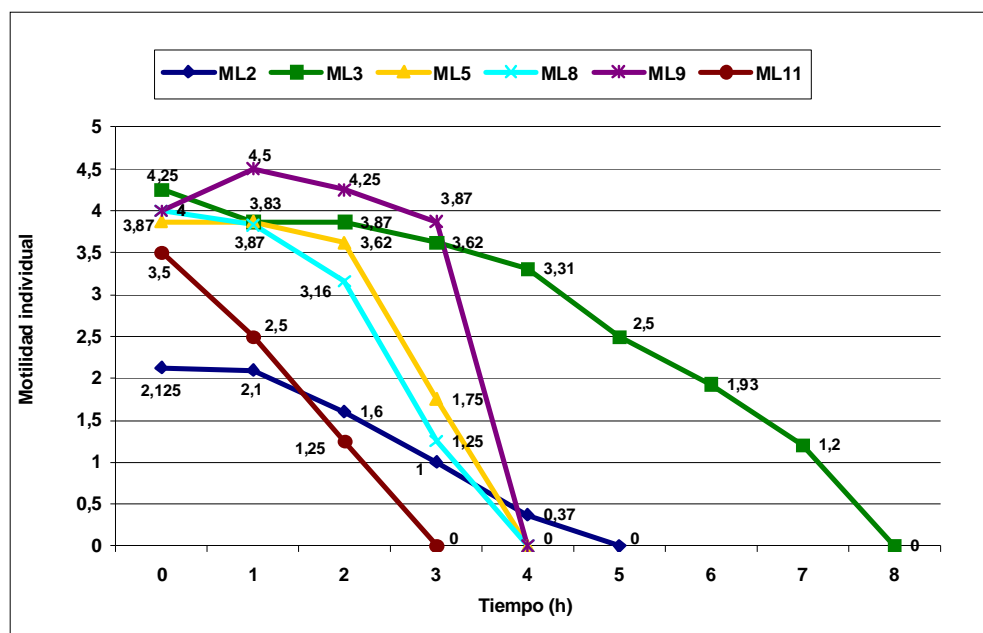


Figura 13. Motilidad individual en test de resistencia térmica espermática a la descongelación de semen recongelado ST (valores promedio).

Tabla 11. Valores promedio y estadísticos en test de resistencia. Evolución de la motilidad individual del semen recongelado ST (n=6).

(h)	0	1	2	3	4	5
Promedio	3'62	3'44	2'96	1'91	0'74	1'25
SD	0'77	0'93	1'24	1'52	1'45	1'77
CV (%)	21'27	27'03	41'89	79'84	197	141'6

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; h: horas.

Si observamos los valores obtenidos en la *fig. 14* y en la **tabla 12**, de los seis toros sometidos a este ensayo, ML3 fue el que presentó mayor resistencia en el tiempo en cuanto a motilidad individual, referida al semen recongelado CT, mostrando una diferencia de 3 h con respecto a ML5, que fue el siguiente más resistente. Los peores datos fueron los obtenidos por ML2 y ML11 (1 h), seguidos de ML8 y ML9 con 2 h. En este ensayo, también ML3 vuelve a mantener una motilidad individual muy aceptable (>3) durante más de 2'5 h. Siendo la motilidad para el resto de toros mucho menor, durante este periodo.

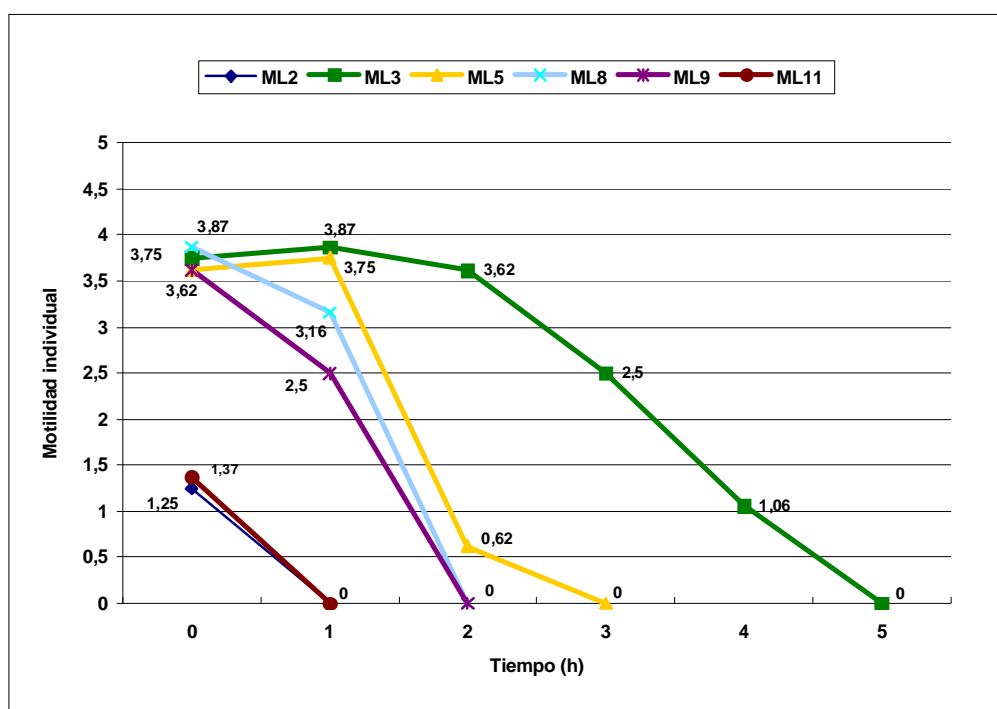


Figura 14. Motilidad individual en test de resistencia espermática de semen recongelado CT (valores promedio).

Tabla 12. Valores promedio y estadísticos en test de resistencia. Evolución de la motilidad individual del semen recongelado CT (n=6).

(h)	0	1	2	3
Promedio	2'91	2'21	1'06	1'25
SD	1'24	1'78	1'73	1'77
CV (%)	42'61	80'54	163'20	141'60

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; h: horas.

Finalmente, se observa (Figs. 12, 13 y 14) que ML3 presentó los valores más elevados con respecto al resto de los toros estudiados en cuanto a motilidad individual en test de resistencia espermática del semen congelado, recongelado CT y recongelado ST. Los toros ML11 y ML2 fueron los que en general presentaron peores resultados. En el resto de los toros destaca ML9, aunque en el último de los ensayos presenta valores muy mediocres. En general, la motilidad de los espermatozoides fue disminuyendo en el tiempo conforme fue aumentando la manipulación realizada a los mismos.

4.2.4. Porcentaje de espermatozoides vivos en test de resistencia en semen congelado y recongelado

En la **tabla 13** se detallan los valores promedio y estadísticos en test de resistencia de espermatozoides vivos en el semen congelado.

Tabla 13. Valores promedio y estadísticos en test de resistencia. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos en el semen congelado (n=6).

(h)	0	1	2	3	4	5	6
Promedio	60	53'33	49'16	35	24	15	11'66
SD	5'48	5'16	8'01	17'88	19'17	14'72	20'21
CV (%)	9'13	9'67	16'29	51'08	79'87	98'13	173'32

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; h: horas.

Según los datos obtenidos en la *fig. 15*, respecto al porcentaje de espermatozoides vivos descongelados en test de resistencia, ML3 es el que demuestra una mayor cantidad de espermatozoides vivos a lo largo del tiempo, llegando su resistencia a las 9 h. ML8 y ML9 presentaron menor resistencia, ambos con 6 h, seguidos de ML5 (5 h) y ML11 (4 h). La menor durabilidad de los espermatozoides en el tiempo correspondió a ML2, con 3 h. ML3 y ML9 presentaron un porcentaje de espermatozoides vivos cercano al 50%, mientras que el resto de los animales se aleja de estos valores a las 3 h del inicio del ensayo, particularmente ML11.

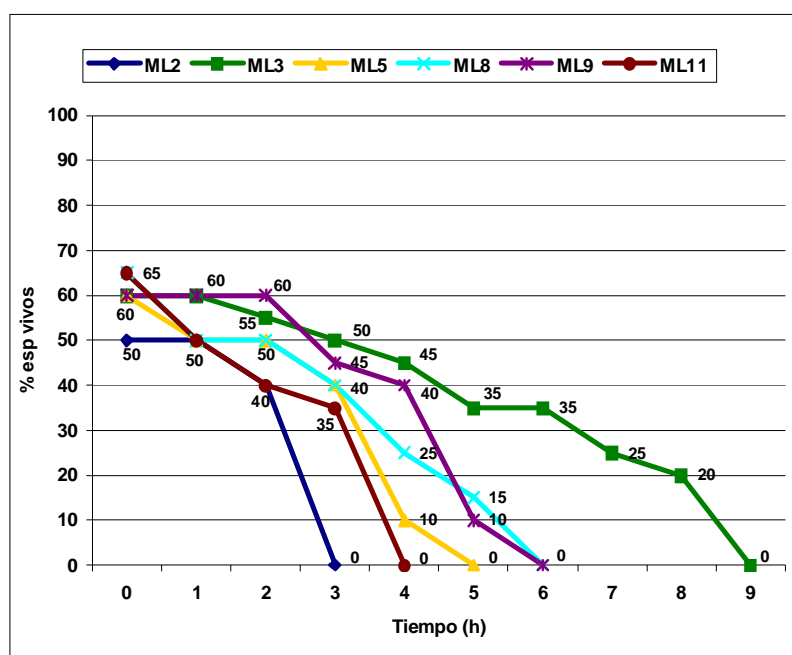


Figura 15. Porcentaje esp vivos de semen congelado en test de resistencia térmica.

En la **tabla 14** se detallan los valores promedio y estadísticos en test de resistencia de espermatozoides vivos en el semen recongelado ST. En la *fig. 16*, donde se representa la resistencia de espermatozoides móviles en el tiempo para este tipo de semen, se muestra que el mayor porcentaje corresponde a ML3, con 8 h de duración. Le siguen, con una diferencia de 3 h, ML2 (5 h) y ML5, ML8 y ML9, éstos últimos con 4 h. ML11 presentó los peores resultados, con 3 h de duración. Los valores promedio por encima del 40% a partir de 2 h del ensayo, pertenecen a ML3 y ML9, mientras que el resto de toros están muy por debajo de estos porcentajes para ese tiempo. Los espermatozoides de ML3 destacan sobre el resto de toros ya desde el inicio del tratamiento.

Tabla 14. Valores promedio y estadísticos en test de resistencia. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos en el semen recongelado ST (n=6).

(h)	0	1	2	3	4	5
Promedio	41'04	31'23	23'37	15'21	6'1	14
SD	13'26	16'39	17'52	15'03	12'95	19'8
CV (%)	32'30	52'48	73'76	98'88	212'3	141'42

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; h: horas.

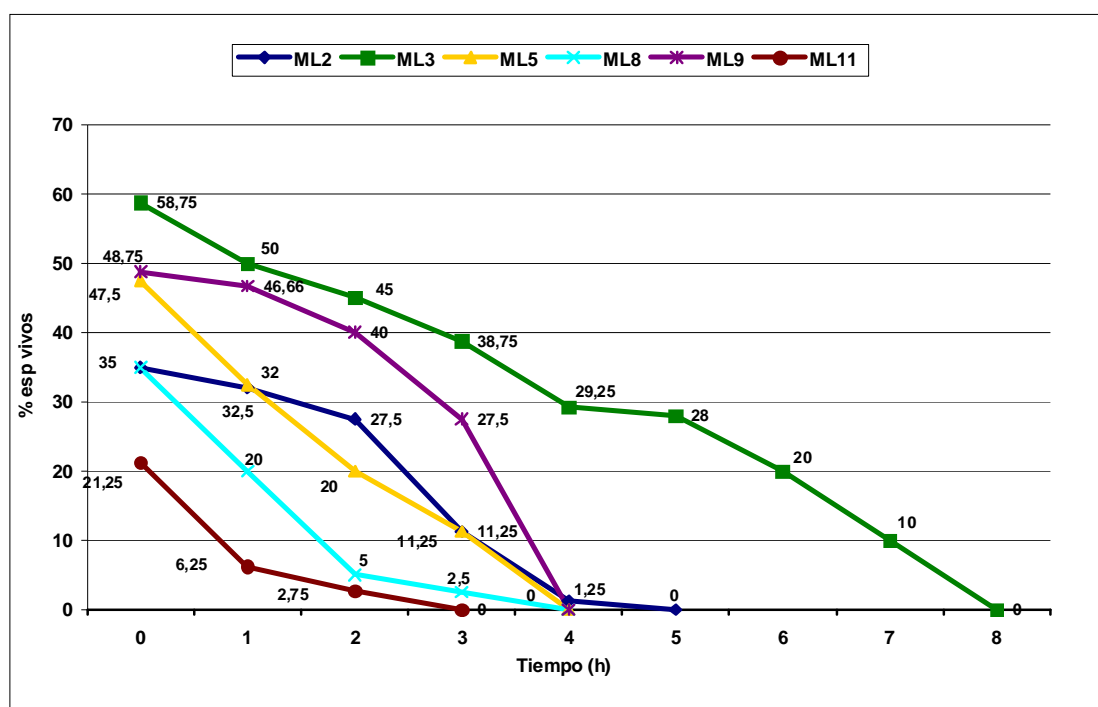


Figura 16. Porcentaje esp vivos en test de resistencia térmica espermática de semen recongelado ST (valores promedio).

En la **tabla 15** se detallan los valores promedio y estadísticos en test de resistencia de espermatozoides vivos en semen recongelado CT. Observando la *fig. 17* (espermatozoides vivos en recongelación espermática CT para test de resistencia térmica en el tiempo) vemos que los espermatozoides de ML3 fueron los que más resistencia volvieron a presentar en el tiempo, con 5 h de supervivencia, seguido de ML5 (3 h), ML8 y ML9 (ambos con 2 h), y por último, ML2 y ML11, que sólo llegaron a 1 h.

Tabla 15. Valores promedio y estadísticos en test de resistencia térmica. Evolución del porcentaje de espermatozoides vivos en el semen recongelado CT (n=6).

(h)	0	1	2	3
Promedio	21	11'88	4'06	3'75
SD	16'75	17'74	7'31	5'3
CV (%)	79'76	149'32	180'04	141'33

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación; h: horas.

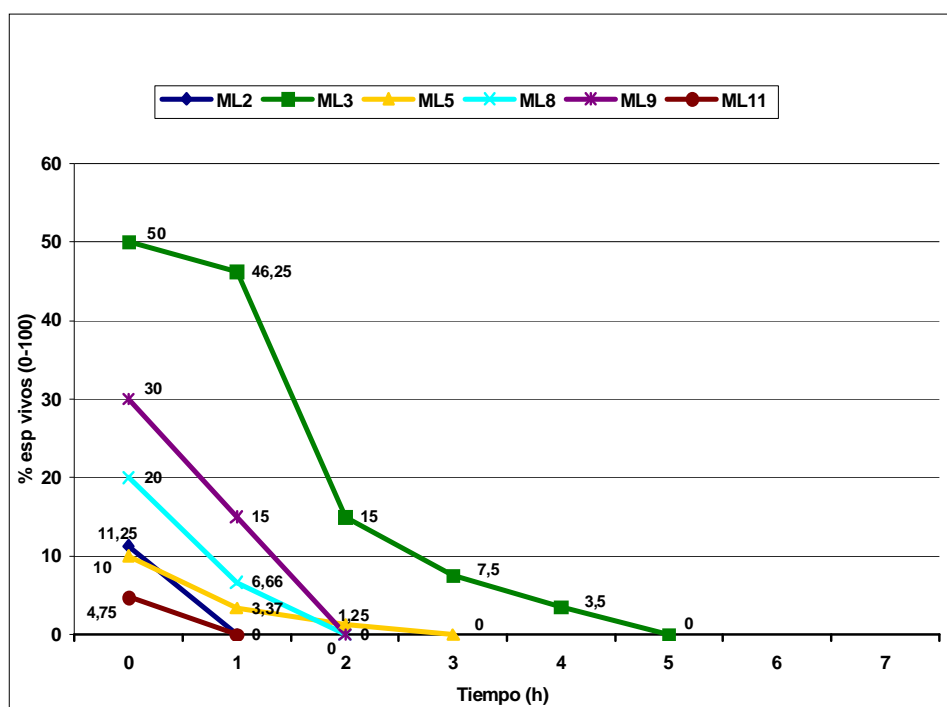


Figura 17. Porcentaje de esp vivos en test de resistencia térmica espermática de semen recongelado CT (valores promedio).

De los resultados obtenidos de las *figuras 15, 16 y 17*, hay que destacar que el toro ML3 es el que obtiene, con diferencia, los mejores resultados en cuanto a cantidad de espermatozoides vivos en test de resistencia térmica. Por otra parte, los toros ML2 y ML11 consiguen, en general, los peores resultados para este parámetro, cualquiera que sea el proceso seguido para su preservación. En general, podemos decir, que el porcentaje de espermatozoides vivos para cada uno de los ejemplares fue disminuyendo conforme fue aumentando el manejo de los espermatozoides.

4.2.5. Integridad de la membrana plasmática en semen congelado y recongelado

Si analizamos la *fig. 18*, referida al estudio comparativo de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante la utilización de la tinción E-N del semen congelado, recongelado CT y recongelado ST, vemos que se obtuvieron resultados que nos muestran que en cuanto al semen congelado, las membranas celulares menos dañadas fueron las de ML9 (30'3%

esp teñidos), seguido de ML3 (38'6%), ML11 (47'6%), ML5 (50%), ML2 (55'3%) y ML8 (58'6%). Por otra parte, en los resultados obtenidos para el semen recongelado ST, las membranas menos dañadas fueron las de ML3 (43'8% esp teñidos), seguido de ML9 (53'97%), ML5 (69'9%), ML2 (71'3%), ML8 (73'77%) y ML11 (78'12%). La media de espermatozoides cuya integridad de membrana resultó dañada fue de 46'73% para semen congelado, 74,71% para semen recongelado CT y de 65'14% para recongelado ST. En última instancia, los resultados de semen recongelado CT con membranas menos dañadas, se correspondieron con ML3 (48'75%), seguido de ML9 (75'75%), ML2 (76'15%), ML5 (78'57%), ML8 (81'72%) y ML11 (87'32%).

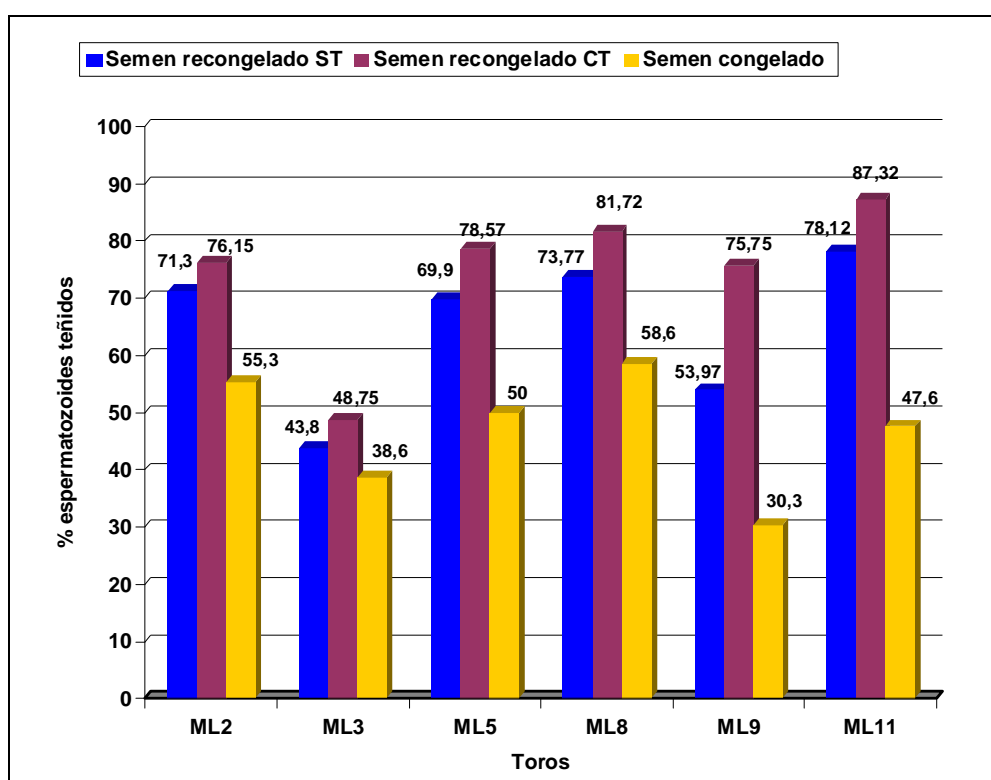


Figura 18. Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide con tinción E-N en semen congelado, recongelado ST y CT (valores promedio).

En la **tabla 16** se refieren los estadísticos con respecto a los valores promedio de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante tinción E-N en semen congelado y recongelado (CT y ST).

Tabla 16. Estudio estadístico y valores promedio de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante tinción E-N en semen congelado y recongelado (CT y ST) (n= 6)

a) Para el conjunto de los 6 toros (% de esp teñidos)

	ST	CT	C
Promedio	65'14	74'71	46'73
SD	13'29	13'42	10'6
CV (%)	20'40	17'94	22'68

ST: semen recongelado sin tratamiento previo; CT: semen recongelado con tratamiento previo; C: semen congelado; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Por donante

b.1) Semen recongelado ST (% esp teñidos)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	71'37	43'8	69'9	73'77	53'97	78'12
SD	2'45	7'86	3'27	2'17	3'7	4'03
CV (%)	3'43	17'94	4'67	2'94	6'83	5'15

b.2) Semen recongelado CT (% esp teñidos)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	76'15	48'75	93'5	81'72	75'75	87'32
SD	4'98	2'75	2'64	1'09	3'59	3'97
CV (%)	6'53	5'64	2'8	1'33	4'73	4'55

b.3) Semen congelado (% de esp teñidos)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	55'32	38'62	50	58'62	30'3	47'62
SD	0'92	0'63	1'29	0'85	0'62	0'75
CV (%)	1'66	1'63	2'58	1'45	2'04	1'57

En la *fig. 19* representamos la integridad de la membrana espermática en semen congelado, semen recongelado ST y CT, mediante valoración con IP. En el caso del semen congelado, el toro cuyo semen presentó una mayor cantidad de espermatozoides con membrana dañada fue ML11 (61'4%). Al que siguieron ML9 (55'5%), ML8 (51%), ML2 (50%), ML3 (43%) y, por último, ML5 con un 28%. Los porcentajes promedio de espermatozoides con membrana dañada obtenidos mediante IP fueron de 48'15% para semen congelado, 91'4% para semen recongelado CT y 80'26% para semen recongelado ST. En el estudio realizado con semen recongelado CT, ML11 y ML5 mostraron los peores resultados (98'5 y 98'8%, respectivamente). Continuando con ML8 (90'9%), ML2 (89'7%), ML3 (86%) y ML9 (84'7%). Por último, en el estudio de este parámetro para semen recongelado ST, el toro con mayor número de espermatozoides con membrana dañada fue ML11 (93'2%); seguido de ML2 (92%), ML8 (87'37%), ML5 (83'1%) y ML9 (65'5%). Los mejores resultados fueron los obtenidos por ML3, con un 60'4% de espermatozoides dañados.

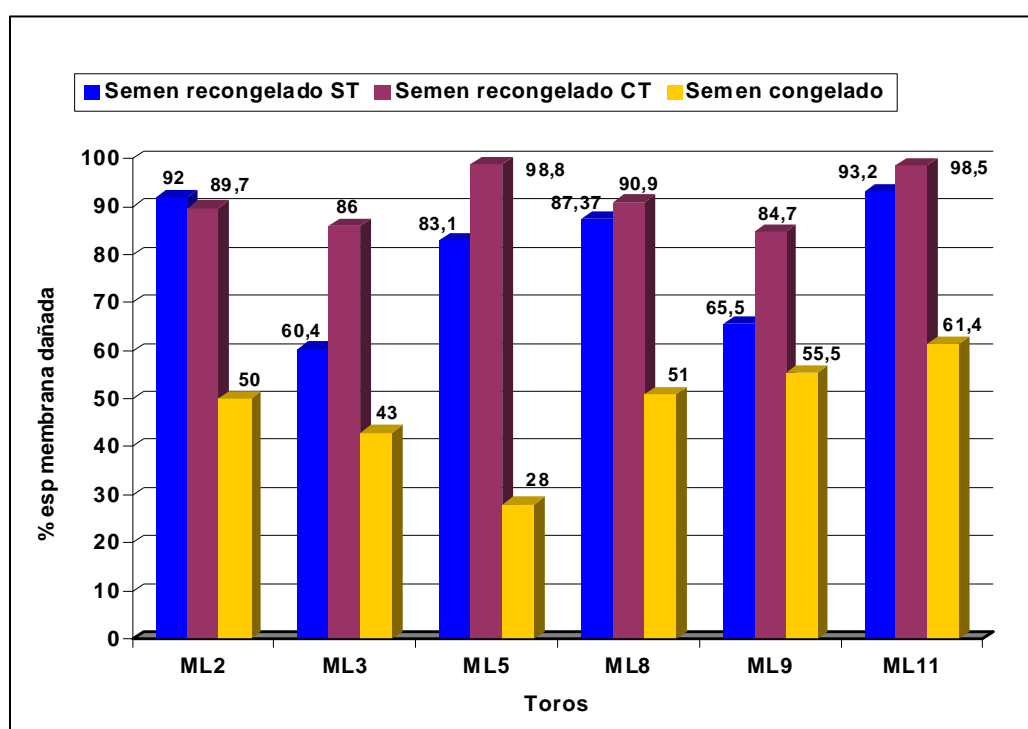


Figura 19. Estudio de la integridad de la membrana espermática mediante IP en semen congelado, recongelado ST y CT.

En la **tabla 17** se refieren los estadísticos con respecto a los valores promedio de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante IP en semen congelado y recongelado (ST y CT).

Tabla 17. Estudio estadístico y valores promedio de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante IP en semen congelado y recongelado (ST y CT) (n= 6).

a) Para el conjunto de los 6 toros (% esp teñidos)

	ST	CT	C
Promedio	80'26	91'43	48'15
SD	13'97	6'04	11'61
CV (%)	17'40	6'60	24'11

ST: semen recongelado sin tratamiento previo; CT: semen recongelado con tratamiento previo; C: semen congelado; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Por donante

b.1) Semen recongelado ST (% esp teñidos)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	92	60'42	83'12	87'37	65'5	93'25
SD	0'41	1'03	0'85	4'61	2'08	1'71
CV (%)	0'44	1'7	1'03	5'27	3'17	1'83

b.2) Semen recongelado CT (% esp teñidos)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	89'75	86	98'82	90'87	84'75	98'5
SD	2'02	2'58	0'69	3'32	4'57	0'76
CV (%)	2'25	3	0'7	3'65	5'39	0'77

b.3) Semen congelado (% esp teñidos)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	50	43	28	51	55	61'37
SD	1'82	2'55	2'94	2'27	1'82	2'56
CV (%)	3'64	5'93	10'50	4'45	3'30	4'16

De los resultados que se representan en las *figs. 18 y 19*, se observa que la integridad de la membrana, valorada mediante tinciones E-N e IP, resulta menos dañada en el caso de semen congelado, seguido de semen recongelado ST, para todos los toros estudiados. Por contra, la recongelación espermática CT, produjo un daño en la integridad de la membrana más elevado que en la congelación y recongelación ST para ambas técnicas de tinción.

Específicamente, los toros con mayor daño en la membrana espermática tras la recongelación CT fueron ML5, ML8 y ML11. En ML5 con 78'57% de membranas dañadas para E-N y 98'8% para IP; en ML8 con 81'72% para E-N y 90'9% con IP; y ML11, con un 87'32% para E-N y 98'5% para IP. Por otra parte, ML3 y ML9 obtuvieron los valores más bajos en recongelación CT. En ML3, con 48'75% de espermatozoides con membrana dañada para E-N y 86% con IP; y en ML9, con 75'75% para E-N y 84'7% para IP.

En cuanto a la recongelación ST, se puede resaltar que los valores más bajos encontrados tanto para E-N e IP observados, se dan en ML3 y ML9. En ML3, un 43'8% de espermatozoides con membrana dañada para E-N, y 60'4% con IP; y en ML9, un 59'97% para E-N y un 65'5% para IP.

Por otro lado, los valores más altos hallados, coincidentes en ambas figuras, fueron los de ML2, ML8 y ML11. Siendo los datos resultantes de tinción E-N de 71'3% para ML2, 73'77% para ML8 y 78'12% para ML11; y los obtenidos con IP, 92% para ML2, 87'37% para ML8 y 93'2% para ML11.

En la *fig. 19* vemos que, en el caso del semen congelado, el toro cuyo semen presentó una mayor cantidad de espermatozoides emitiendo fluorescencia roja debido a la penetración de IP, y por tanto, membrana dañada, fue ML11 (61'4%). Le siguieron ML9 (55'5%), ML8 (51%), ML2 (50%), ML3 (43%) y, por último, ML5, con 28% de esp. con membrana deteriorada.

Los porcentajes promedio de espermatozoides con membrana dañada obtenidos mediante IP para semen congelado fue del 48'15%, 91'4% para semen recongelado CT y 80'26% para semen recongelado ST.

En el estudio realizado con el semen recongelado CT, los toros ML11 y ML5 mostraron los peores resultados (98'5% y 98'8%, respectivamente). Continuando con ML8, con 90'9% de espermatozoides con membrana deteriorada, ML2 (89'7%), ML3 (86%) y ML9 (84'7%).

Por último, el estudio de este parámetro para el semen recongelado ST arrojó como resultado que el toro con el mayor número de espermatozoides con membrana dañada fue ML11 (93'2%); seguido por ML2 (92%), ML8 (87'37%), ML5 (83'1%) y ML9 (65'5%). Los mejores resultados fueron los obtenidos por ML3, con 60'4% de espermatozoides con membrana dañada.

4.2.6. Estudio de los acrosomas en semen congelado y recongelado

La *fig. 20* muestra los resultados obtenidos del estudio de los acrosomas de los espermatozoides mediante la utilización de lectina PNA. En semen congelado, los sementales ML2, ML8, ML9 fueron los que presentaron mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado (44%), seguido de ML11 (43%) y ML5 (33'4%). ML3 fue el animal con menor porcentaje de acrosomas dañados (23%).

Cuando se realizó el mismo estudio para semen recongelado CT, ML8 obtuvo un 80'3% de acrosomas dañados, seguido de ML2 (76%), ML11 (67'9%), ML5 (54'9%) y ML9 (40'1%). En este caso, ML3 también fue el que mejores resultados obtuvo, con sólo 32'7% de acrosomas dañados. Para el estudio de semen recongelado ST, el porcentaje de acrosomas más elevado correspondió a ML8, con un 76'6%, seguido de ML2 (60'9%), ML11 (54'3%), ML5 (52%) y ML9 (28'9%). El porcentaje más bajo obtenido fue para ML3, con un 22% de acrosomas dañados.

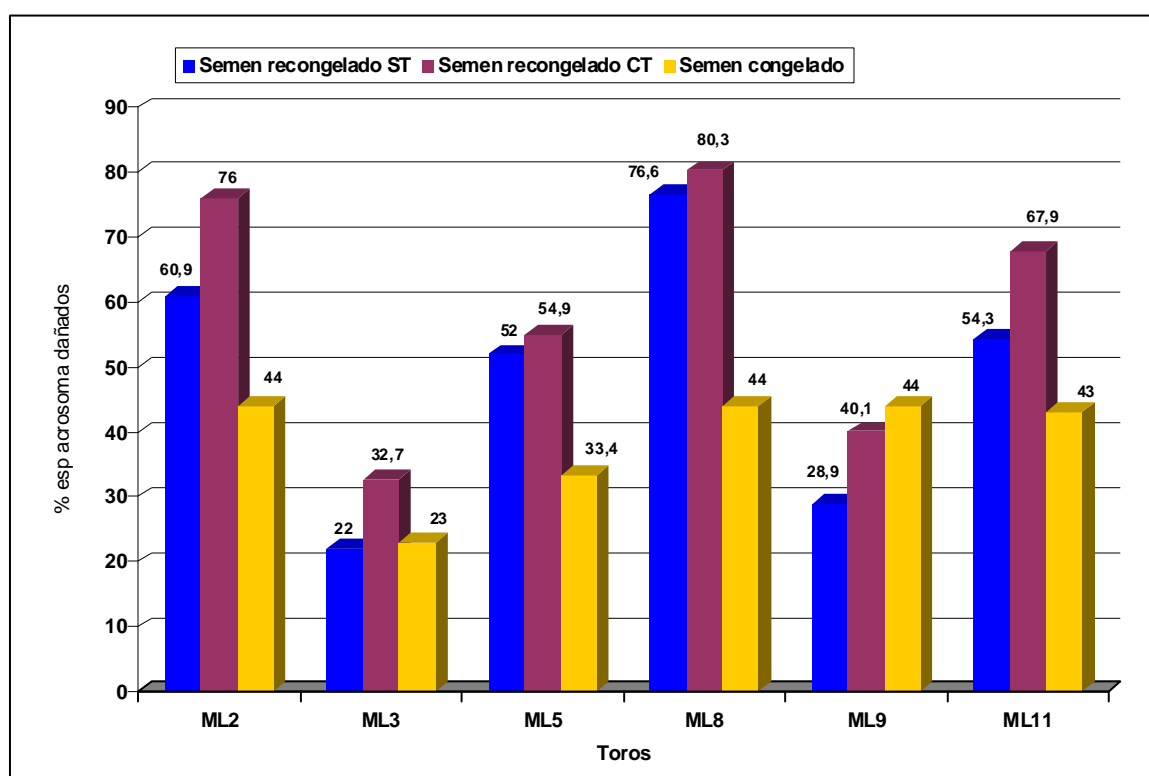


Figura 20. Estudio de acrosomas dañados, valorados mediante lectina PNA, en semen congelado, recongelado ST y CT.

En la **tabla 18** se refieren los estadísticos y valores promedio de acrosomas dañados, valorados mediante lectina PNA, en semen congelado y recongelado ST y CT.

Tabla 18 Estudio estadístico y valores promedio de acrosomas dañados, valorados por PNA en semen congelado y recongelado (ST y CT) (n= 6).

a) Para el conjunto de los 6 toros (% esp dañados)

	ST	CT	C
Promedio	49'11	58'65	38'56
SD	20'36	19'43	8'68
CV (%)	41'45	33'11	22'51

ST: semen recongelado sin tratamiento previo; CT: semen recongelado con tratamiento previo; C: semen congelado; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Por donante:

b.1) Semen recongelado ST (% esp. dañados)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	60'87	22	52	76'6	28'87	54'25
SD	1'31	1'96	1'82	1'36	1'31	1'71
CV (%)	2'15	8'90	3'5	1'76	4'53	3'14

b.2) Semen recongelado CT (% esp. dañados)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	76	32.7	54'92	80'32	40'1	67'9
SD	1'82	1'01	1'49	0'91	1'59	1'64
CV (%)	2'39	3'08	2.71	1'13	3'96	2'41

b.3) Semen congelado (% esp. dañados)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	44	23	33'42	44	44	43
SD	1'82	1'82	1'18	1'47	1'58	1'82
CV (%)	4'15	7'95	3'53	3'34	3'59	4'23

Los valores máximos obtenidos para el conjunto de valores de los seis sementales estudiados fue de 80'3% de esp con acrosoma dañado para semen recongelado CT, 76'6% para semen recongelado ST y de 44% para semen congelado. Los valores mínimos fueron de 32'7% para semen recongelado CT, 22% para recongelado ST y 23% para semen congelado.

Los datos para la congelación espermática muestran valores iguales o muy parecidos para todos los sementales, excepto para ML3 (23%). Los valores de las recongelaciones fluctúan más entre sementales, aunque los valores encontrados para semen recongelado CT son mayores que los resultantes para ST en todos los toros. Excepto en el caso de ML9, en todos los demás, los mejores valores se dan en semen congelado, seguido de recongelado CT y ST. EL valor promedio encontrado en todos los toros para acrosomas dañados en semen congelado una sola vez fue 38'56%, de 58'65% para semen recongelado CT y 49'1% para semen recongelado ST.

De los datos obtenidos podemos deducir que ML3 fue, con diferencia, el toro que mejores resultados obtuvo con menor porcentaje de acrosomas dañados para cada uno de los ensayos. ML9 presenta un bajo porcentaje de daño acrosómico en comparación con el resto de sementales ML.

4.2.7. Estudio de la cromatina en semen congelado y recongelado

En la *fig. 21*, referida al daño realizado en la cromatina de los espermatozoides en semen congelado, recongelado CT y ST, encontramos que en el caso del semen congelado, el mayor valor encontrado, y por tanto, el peor resultado obtenido fue para ML11 (12% esp con ADN dañado), seguido de ML2 (10'5%), ML5 (6'3%), ML3 (5%), ML9 (4%) y ML8 (2%). Por otro lado, en el caso del semen recongelado ST, el valor más elevado se encontró para ML9 (10% esp con ADN dañado), seguido de ML11 y ML2 (ambos con un 9%), ML3 (5%), ML8 (4%) y ML5 (2%). Y por último, los datos obtenidos para semen recongelado CT nos muestran que el valor más elevado encontrado fue para ML11 (10% esp ADN dañado), seguido de ML2 (6'5%), ML9 (6%), ML3 (5%), ML8 (4'5%) y ML5 (4%).

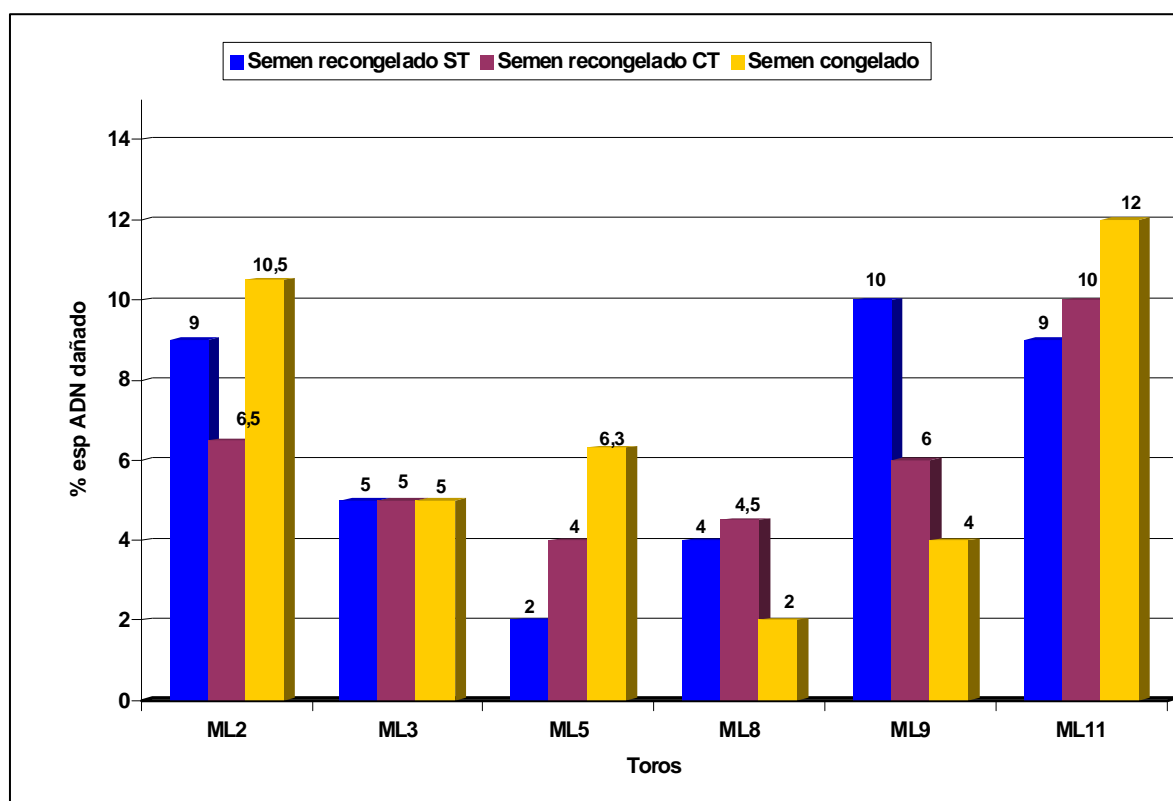


Figura 21. Estudio de la cromatina dañada, mediante tinción de azul de toluidina en semen congelado, recongelado ST y CT.

En la **tabla 19** se refieren los estadísticos con respecto a los valores promedio de cromatina dañada (tinción azul de toluidina) en semen congelado y recongelado (CT y ST).

Tabla 19. Estudio estadístico y valores promedio de cromatina dañada (tinción azul de toluidina) en semen congelado y recongelado (CT y ST) (n= 6).

a) Para el conjunto de los 6 toros (% esp. dañados)

	ST	CT	C
Promedio	6'5	6	6'63
SD	3'27	2'17	3'87
CV (%)	50'30	36'16	58'37

ST: semen recongelado sin tratamiento previo; CT: semen recongelado con tratamiento previo; C: semen congelado; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

b) Por donante

b.1) Semen recongelado ST (% esp. dañados)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	9	5	2	4	10	9
SD	1'22	0'91	0'35	1'47	1'82	1'08
CV (%)	13'55	13'55	17'5	17'5	18'2	12

b.2) Semen recongelado CT (% esp. dañados)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	6'5	5	4	4.5	6	10
SD	1'29	1'47	1'58	1'08	1'47	1'82
CV (%)	19'84	29'4	39'5	24	24'5	18'2

b.3) Semen congelado (% de esp dañados)

	ML2	ML3	ML5	ML8	ML9	ML11
Promedio	10'5	5	6'32	2	4	12
SD	1'47	0'91	1'61	0'41	1'47	1'87
CV (%)	14	18'20	25'55	20'50	36'75	15'58

Se obtuvieron valores máximos de espermatozoides con ADN dañado, 12% para semen congelado y 10% en recongelado CT y ST; y mínimos de 2% para semen congelado, 4% para recongelado CT y 2% para ST.

4.2.8. Estudio de morfoanomalías espermáticas en semen congelado y recongelado

Para ML2, las morfoanomalías más frecuentes fueron las “colas en látigo”, con valores semejantes para cada uno de los tipos de congelación; siendo 6% el porcentaje para esta anomalía en semen recongelado CT, 5'25% para semen recongelado ST y 6'5% para semen congelado (*Fig. 22*). El resto de morfoanomalías, como “cabezas sueltas”, “colas sueltas”, “microcabezas”,

“cabezas redondas”, “colas ovillo” y “cabezas dobladas”, no fueron significativas, encontrándose valores no superiores a 2'12%.

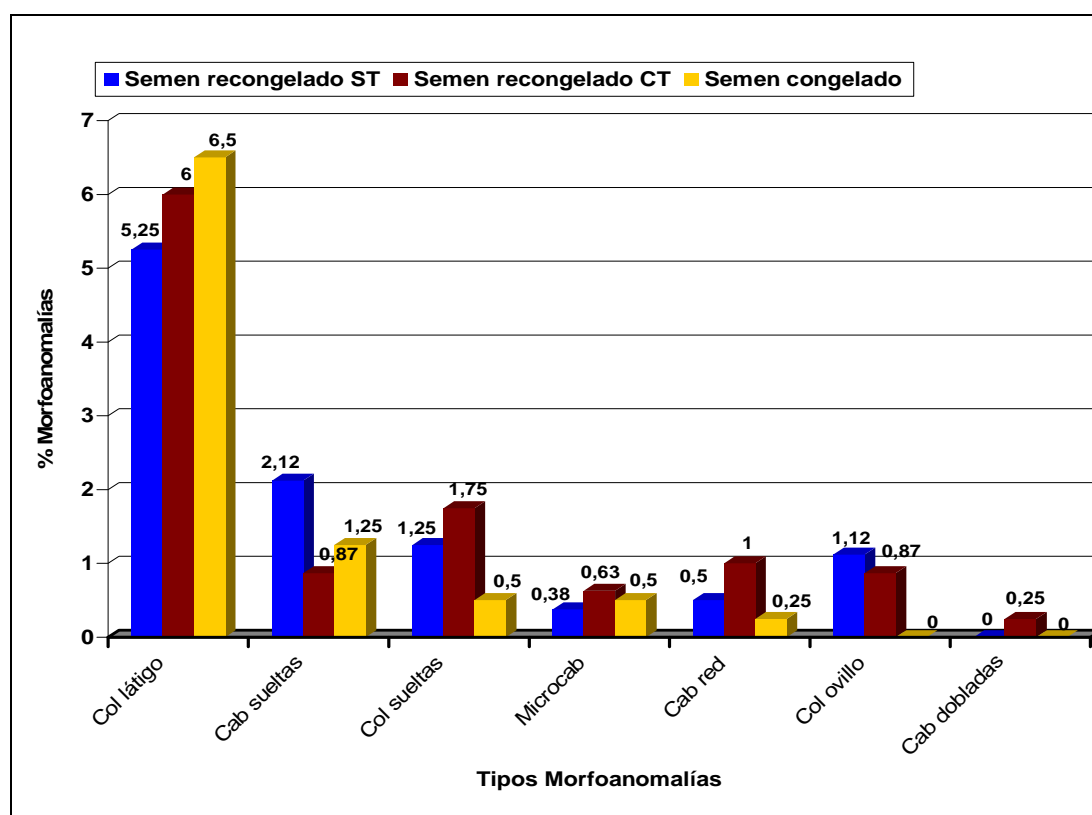


Figura 22. Morfoanomalías espermáticas en semen congelado y re congelado de ML2.

En la **tabla 20** se refieren los estadísticos y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas de ML2, en semen re congelado y congelado.

Tabla 20. Estudio estadístico y valores promedio de morfoanomalías espermáticas de ML2, en semen re congelado y congelado.

a) Semen re congelado ST

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Cabezas redondas	Colas en ovillo
Promedio	5'25	2'12	1'25	0'38	0'5	1'12
SD	1'85	1'25	0'29	0'48	0'41	0'75
CV (%)	35'23	58'96	23'20	129'7	82	66'96

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Semen recongelado CT

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Cabezas redondas	Colas en ovillo	Colas dobles
Promedio	6	0'87	1'75	0'63	1	0'87	0'25
SD	2'55	0'75	0'29	0'75	2	0'48	0'29
CV (%)	42'5	86'2	16'6	121	200	55'2	116

c) Semen congelado

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Cabezas redondas
Promedio	6'5	1'25	0'5	0'5	0'25
SD	0'7	0'67	0'41	0'46	0'12
CV (%)	10'76	53'6	82	90	48

Por lo que respecta a las morfoanomalías encontradas en el semen del toro ML3, encontramos que existe una mayor proporción de “colas en látigo” en el caso de semen congelado (10'12%), seguido de semen recongelado ST (4'87%) y de semen recongelado CT (2'75%). El resto de anomalías espermáticas se encuentran en menor porcentaje, no superando el 3% (Fig. 23). En la **tabla 21** se refieren los estadísticos y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas de ML3, en semen recongelado y congelado.

Tabla 21. Estudio estadístico y valores promedio de morfoanomalías espermáticas de ML3, en semen recongelado y congelado.

a) Semen recongelado ST

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Cabezas redondas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	4'87	1'5	1'5	0'5	2'25	0'12
SD	2'87	0'91	0'91	1	1'19	0'25
CV (%)	58'93	60'66	60'66	200	52'88	208'33

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Semen recongelado CT

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Cabezas redondas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	2'75	2'62	1'25	0'5	3	0'37
SD	1'44	3'09	0'5	0'41	1'15	0'48
CV (%)	19'09	117'93	40	82	38'33	129'72

c) Semen congelado

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Cola en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	10'12	0'75	1'5	1'5	0'25
SD	2'01	0'54	0'48	0'83	0'13
CV (%)	19'86	138'88	31'33	55'33	52

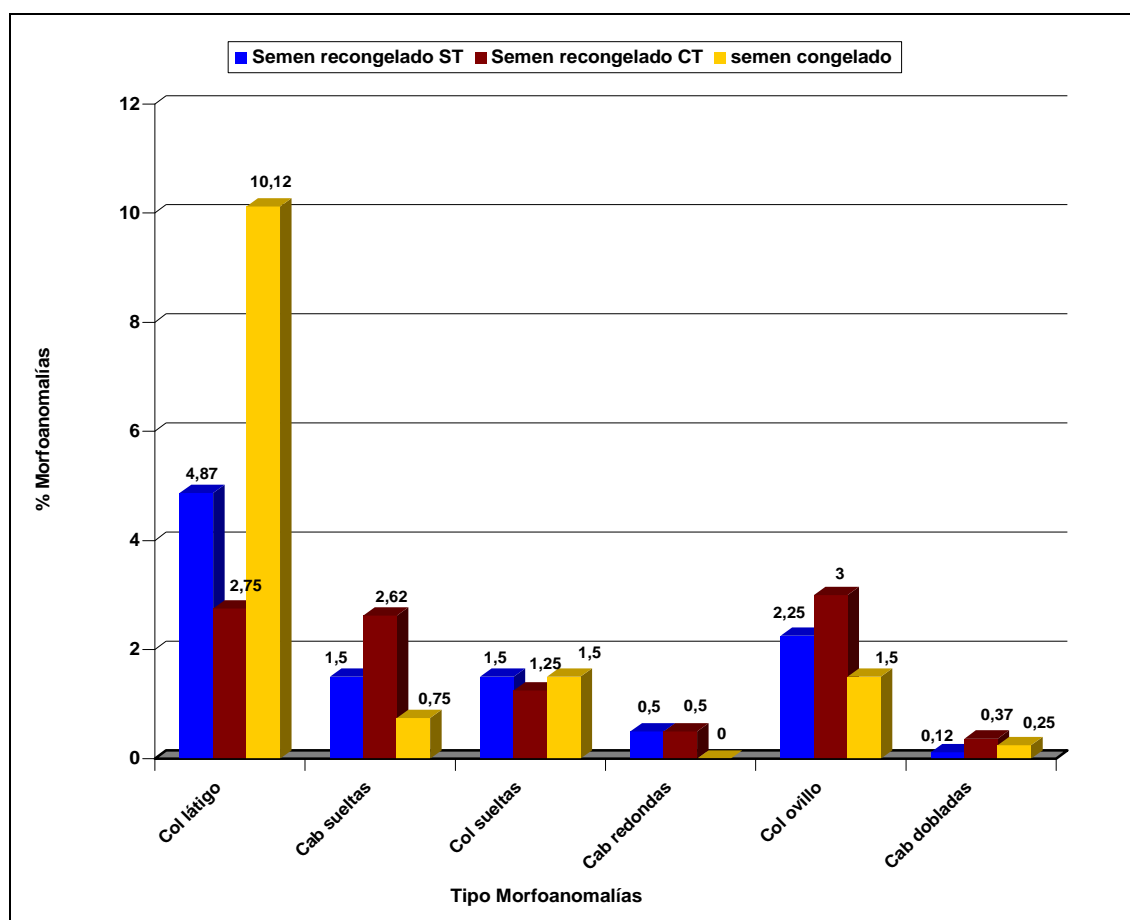


Figura 23. Morfoanomalías espermáticas en semen congelado y recongelado de ML3.

En la *fig. 24*, referente al estudio de las morfoanomalías espermáticas para ML5, observamos que destacan las “cabezas sueltas”, con un 9’25% para semen recongelado CT, 5’37% para semen recongelado ST y 3’5% para semen congelado. Las “colas en látigo” fueron otra de las anomalías espermáticas más frecuentes con 2’12% en semen recongelado CT, 4% en recongelado ST y 6% en semen congelado. Las “colas sueltas” se presentaron en un 2’5% para semen congelado, 3’25% en recongelado ST y 5% en semen recongelado CT. El resto de anomalías encontradas (“cabezas redondas”, “colas en ovillo” y “cabezas dobladas”) oscilaron entre 0 y 1%. En la **tabla 22** se refieren los estadísticos y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas de ML5, en semen recongelado y congelado.

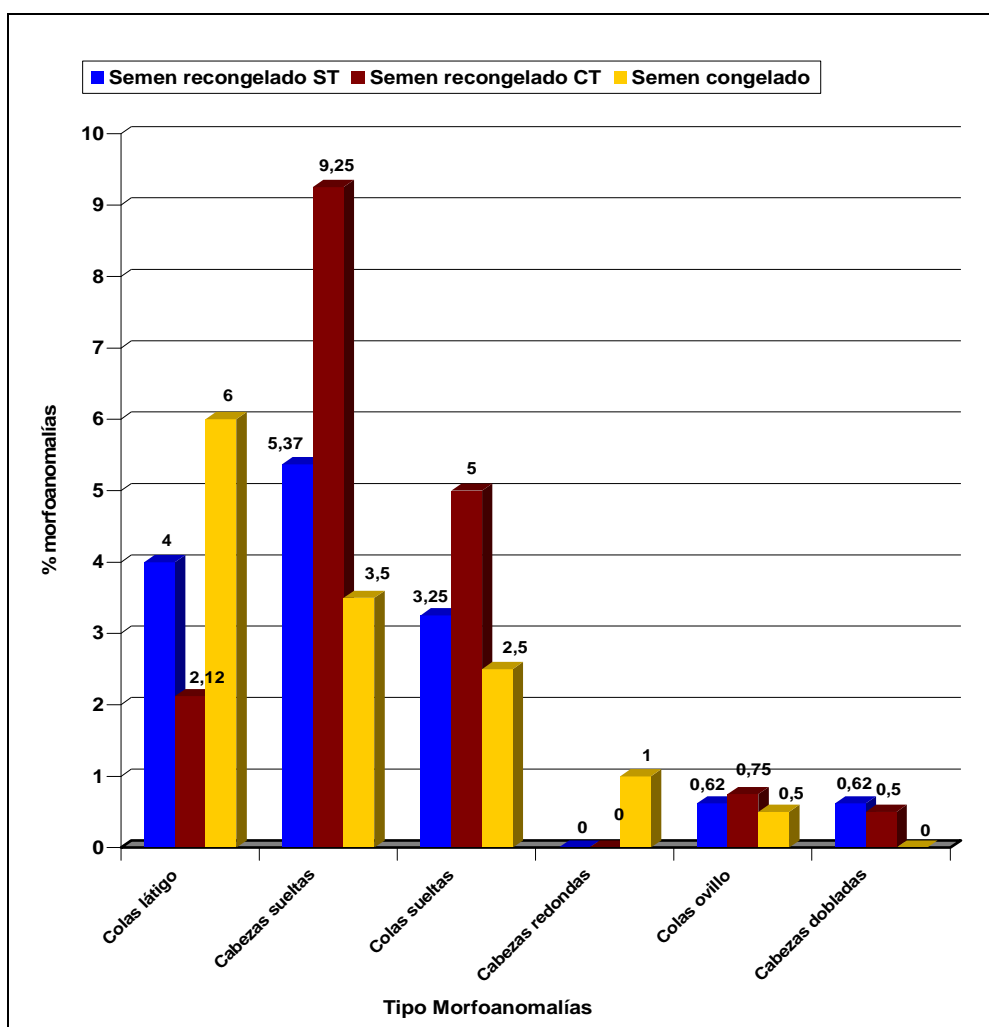


Figura 24. Morfoanomalías espermáticas en semen congelado y recongelado en ML5.

Tabla 22. Estudio estadístico y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas de ML5, en semen recongelado y congelado.

a) Semen recongelado ST

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	4	5'37	3'25	0'62	0'62
SD	1'08	1'03	0'86	0'63	0'48
CV (%)	27	19'18	26'46	100	77'41

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Semen recongelado CT

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	2'12	9'25	5	0'75	0'5
SD	0'63	2'78	1'08	0'64	0'71
CV (%)	29'71	30'05	21'60	85'33	142

c) Semen congelado

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Cabezas redondas	Colas en ovillo
Promedio	6	3'5	2'5	1	0'5
SD	1'08	1'08	0'72	0'41	0'08
CV (%)	18	30'85	28'80	41	16

En la *fig. 25*, que representa las anomalías morfológicas en los espermatozoides de ML8, podemos observar que la anomalía “colas en látigo” destaca sobre todas las demás, tanto en semen congelado (10%), como en recongelado CT (9'62%) y ST (9'12%). Otras anomalías fueron “cabezas sueltas” con 4'25% para semen recongelado ST, 3'37% para recongelado CT y 3% para congelado; “colas sueltas” para semen congelado (3'25%); y “colas en ovillo” para semen congelado y recongelado ST con 3'5% en ambos casos. El resto de morfoanomalías como “microcabezas” o “cabezas

dobladas”, así como valores menores de las morfoanomalías ya citadas, van de 0 a 1’5%. En la **tabla 23** se refieren los estadísticos y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas de ML8, en semen recongelado y congelado.

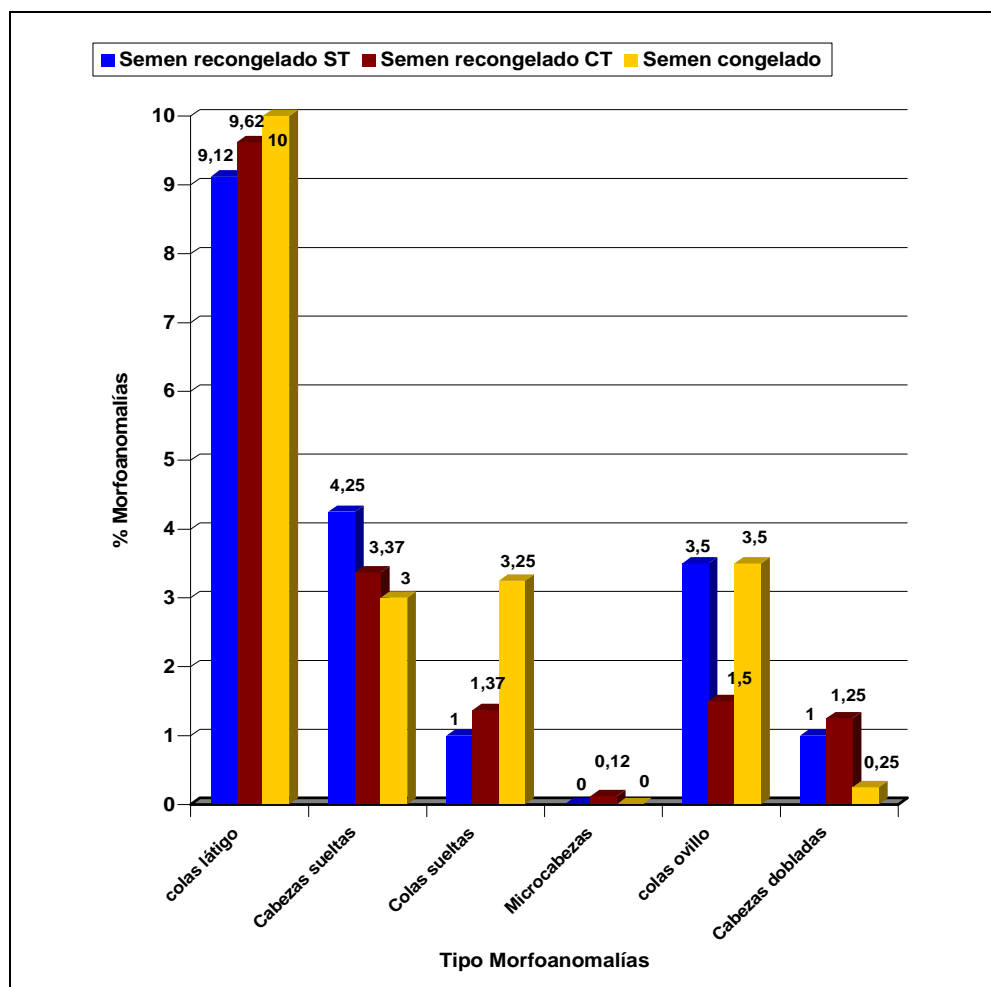


Figura 25. Morfoanomalías espermáticas en semen congelado y recongelado en ML8.

Tabla 23. Estudio estadístico y valores promedio de morfoanomalías espermáticas de ML8, en semen recongelado y congelado.

a) Semen recongelado ST

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	9'12	4'25	1	3'5	1
SD	2'32	0'96	1'35	1'78	1'08
CV (%)	25'43	22'58	135	50'85	108

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Semen recongelado CT

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	9'62	3'37	1'37	0'12	1'5	1'25
SD	1'25	0'85	0'48	0'25	0'91	0'29
CV (%)	12'99	25'22	35'03	208'33	60'66	23'20

c) Semen congelado

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	10	3	3'25	3'5	0'25
SD	1'41	0'81	0'61	0'64	0'1
CV (%)	14'10	27	18'76	18'28	40

La *fig. 26* nos muestra los valores morfológicos anormales referentes a ML9. En éste se hallaron en mayor cantidad “colas en látigo”, con 16'62% en semen recongelado ST; 16'25% en el caso del semen congelado y 7'5% para semen recongelado CT. Las “colas en ovillo” se observaron también en un alto porcentaje, con 8% en semen recongelado ST, 7% en semen recongelado CT, y 4'5% para semen congelado.

Además de las anomalías morfológicas anteriormente citadas, se encontraron otras como son “cabezas sueltas”, “colas sueltas”, “microcabezas” o “cabezas dobladas” que en conjunto conforman los porcentajes más bajos para este toro con un rango de 0 a 2'37%.

En la **tabla 24** se refieren los estadísticos y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas de ML9, en semen recongelado y congelado.

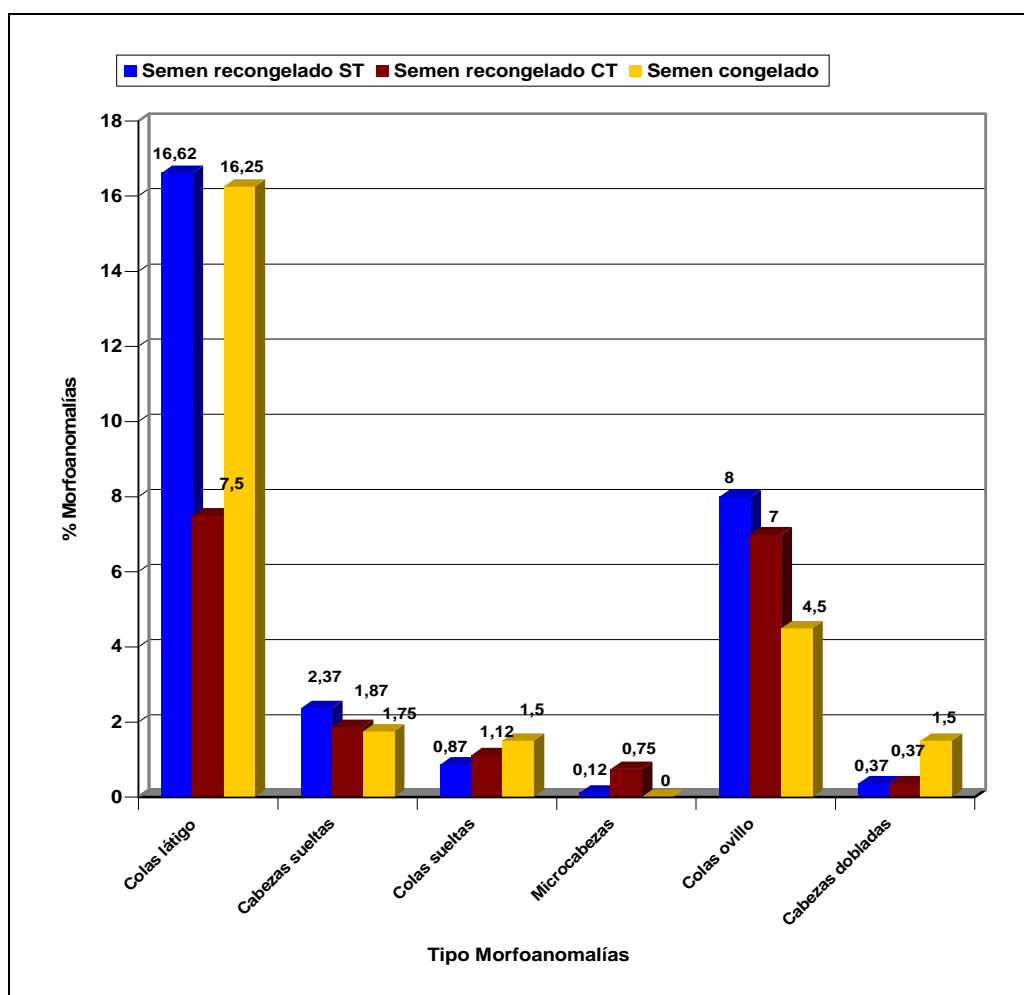


Figura 26. Morfoanomalías espermáticas en semen congelado y recongelado de ML9.

Tabla 24. Estudio estadístico y valores promedio de morfoanomalías espermáticas de ML9, en semen recongelado y congelado

a) Semen recongelado ST

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	16'62	2'37	0'87	0'12	8	0'37
SD	3'2	0'63	0'25	0'25	1'96	0'48
CV (%)	19'25	26'58	28'73	200	24'50	129'72

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Semen recongelado CT

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	7'5	1'87	1'12	0'75	7	0'37
SD	0'71	1'11	1'11	0'64	2'83	0'48
CV (%)	9'46	59'35	98'66	85'33	40'42	129'72

c) Semen congelado

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	16'25	1'75	1'5	4'5	1'5
SD	1'62	0'35	0'54	1'08	0'74
CV (%)	9'96	20	36	24	49'33

La *fig. 27* muestra las anomalías morfológicas encontradas en el semen de ML11. Del estudio realizado se desprende que las “cabezas sueltas”, con un 10'5% en semen recongelado ST, 1'5% en semen congelado y 7'37% en semen recongelado CT, son las que se presentan en mayor porcentaje; así como “colas en látigo”, con 9'5% para semen recongelado ST; 12'12% para semen recongelado CT y 13% para semen congelado. En menor medida se encuentran “colas sueltas”, con 7% en semen congelado, 5'87% en semen recongelado ST y 4'75% en semen recongelado CT.

Además, otras morfoanomalías halladas fueron “microcabezas”, “cabezas redondas”, “colas ovillo” y “cabezas dobladas”, con valores muy bajos con respecto a las tres anteriores, oscilando entre 0 y 1'83%.

En la **tabla 25** se refieren los estadísticos y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas de ML11, en semen recongelado y congelado.

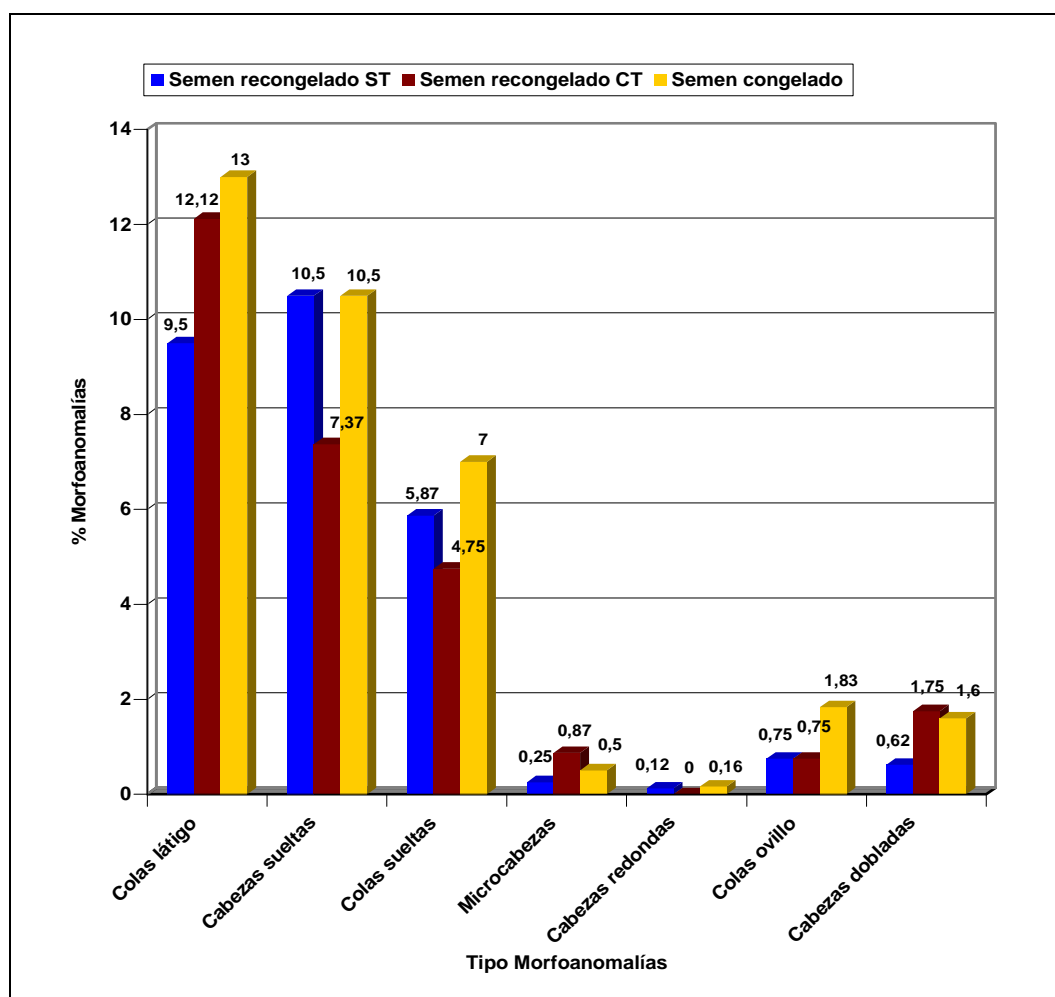


Figura 27. Morfoanomalías espermáticas en semen congelado y re congelado de ML11.

Tabla 25. Estudio estadístico y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas del toro ML11, en semen re congelado y congelado

a) Semen re congelado ST

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Cabezas redondas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	9'5	10'5	5'87	0'25	0'12	0'75	0'62
SD	3'34	2'91	1'11	0'11	0'25	0'5	0'75
CV (%)	35'15	27'71	18'90	44	208'33	66'66	120'96

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Semen recongelado CT

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	12'12	7'37	4'75	0'87	0'75	1'75
SD	2'17	5'02	1'04	0'63	0'04	0'5
CV (%)	17'90	68'11	21'89	72'41	5'33	28'57

c) Semen congelado

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Cabezas redondas	Colas en ovillo	Cabezas dobladas
Promedio	13	10'5	7	0'5	0'16	1'83	1'62
SD	1'47	1'08	2'16	0'48	0'06	0'34	0'82
CV (%)	11'30	10'28	30'85	92'30	37'5	19'57	50'61

En la *fig. 28* están representados los valores promedio de las anomalías morfológicas encontradas en los eyaculados de los sementales de la raza estudiados en este ensayo. En conjunto, las anomalías más destacables fueron las “colas en látigo” con un 10'31% para semen congelado, 8'23% para recongelado ST y 6'68% para recongelado CT. Las “cabezas sueltas” también destacaron, aunque en menor medida, con 4'35% para recongelado ST, 4'22% para recongelado CT y 3'46% para semen congelado. Las “colas sueltas” estuvieron presentes entre las morfoanomalías más frecuentes, con 2'29% con respecto al semen recongelado ST, 2'54% en recongelado CT y 2'7% en semen congelado. Las “colas en ovillo” se presentaron con unos porcentajes promedio de 2'7% en recongelado ST, 2'31% en recongelado CT y 1'97% en semen congelado.

Las anomalías morfológicas en una proporción menor a la media fueron “microcabezas”; “cabezas redondas” y “cabezas dobladas”, con valores que oscilaron entre 0 y 0'75%.

El valor promedio de la suma de todas las anomalías morfológicas determinadas para cada tratamiento resulta similar, siendo del 18'36% la suma total en espermatozoides re congelados ST, 17'14% para espermatozoides re congelados CT y 19'43% para los sometidos a un proceso de congelación.

Es de destacar que en la anomalía “colas dobladas”, este porcentaje promedio es ligeramente menor en espermatozoides CT que en los otros dos casos, lo que puede estar influenciado por la centrifugación de los espermatozoides practicada en este tratamiento, ya que muchos de los espermatozoides con colas dobladas resultaron eliminados durante este proceso.

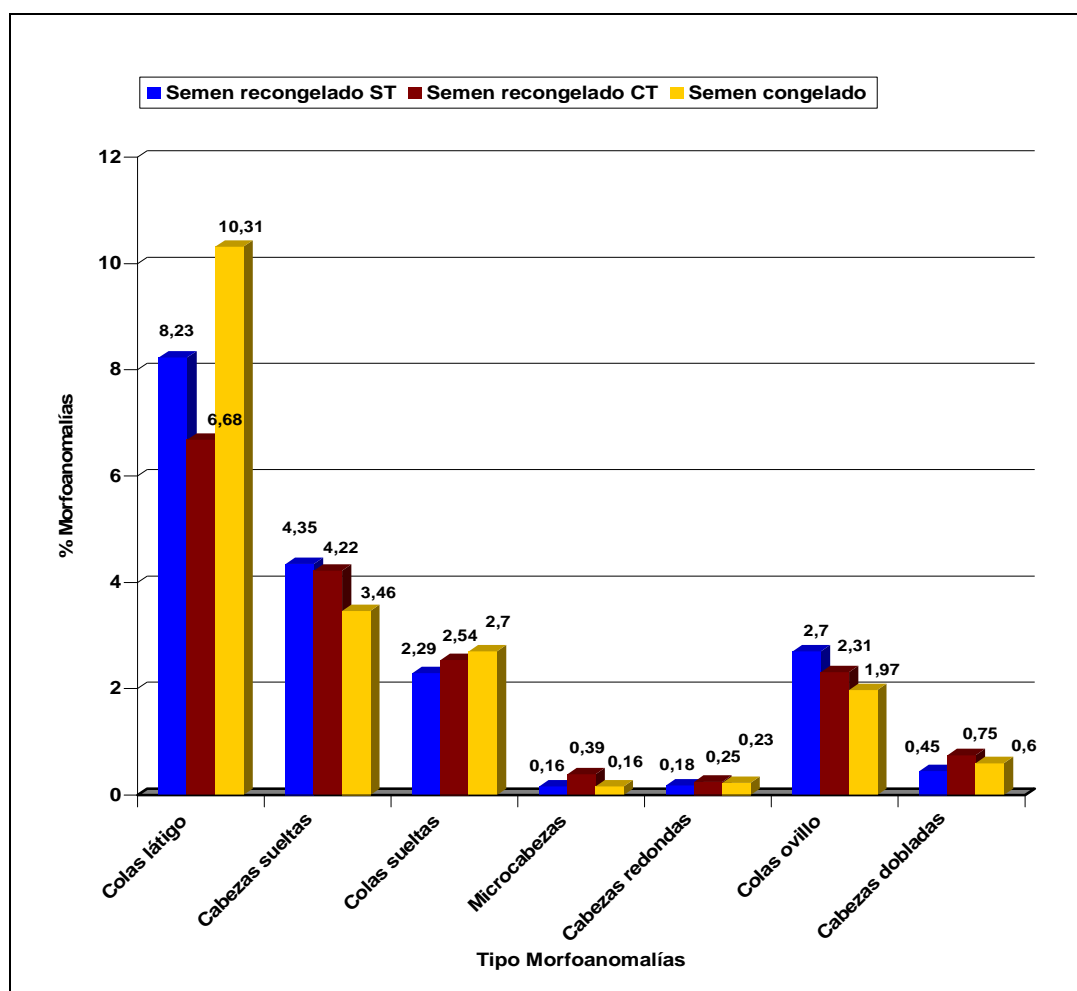


Figura 28. Morfoanomalías espermáticas en semen congelado y re congelado de toros ML.

En la **tabla 26** se refieren los estadísticos y valores promedio de las morfoanomalías espermáticas de los toros ML estudiados, referidas a semen recongelado y congelado.

Tabla 26. Valores estadísticos y promedio de las morfoanomalías espermáticas en semen recongelado y congelado de toros ML.

a) Semen recongelado ST

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Cabezas redondas	Colas en oville	Cabezas dobladas
Promedio	8'23	4'35	2'29	0'16	0'18	2'7	0'45
SD	4'71	3'34	1'95	0'22	0'25	2'81	0'37
CV (%)	57'29	76'78	85'58	137'5	138'88	103'69	82'22

SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

b) Semen recongelado CT

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Cabezas redondas	Colas en oville	Cabezas dobladas
Promedio	6'68	4'22	2'54	0'39	0'25	2'31	0'75
SD	3'89	3'32	1'82	0'4	0'42	2'45	0'61
CV (%)	58'23	78'67	71'65	102'56	168	106'06	81'33

c) Semen congelado

	Colas en látigo	Cabezas sueltas	Colas sueltas	Micro-cabezas	Cabezas redondas	Colas en oville	Cabezas dobladas
Promedio	10'31	3'46	2'7	0'16	0'23	1'97	0'6
SD	3'89	3'60	2'3	0'26	0'39	1'69	0'74
CV (%)	37'73	104'04	85'18	162'50	169'56	87'56	123'33

4.3. *Experiencia 3. Uso de la IA para la valoración de la fertilidad del semen recongelado*

La **tabla 27** nos muestra los resultados de la IA realizada a 7 novillas Frisonas utilizadas para el ensayo de fertilidad del semen recongelado ST. Las 7 hembras fueron sincronizadas mediante la aplicación de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR[®]) que se mantuvo durante 7 días, transcurrido este tiempo, se aplicó una dosis de PGF2 α (*Dinolitic*[®]) y un día más tarde se retiraron los dispositivos.

Dada la presencia de síntomas de celo en todas las hembras tras la sincronización, a todas se les aplicó una dosis de semen dos veces mediante IA, con un intervalo de 12 h. De las 7 novillas inseminadas, 2 de ellas (28'57%) volvieron a presentar síntomas de celo 21 días más tarde, lo que nos indica que esas dos novillas con seguridad no quedaron gestantes tras la IA.

A los 45 días post-IA, se realizó una ecografía a cada una de las 5 novillas que seguían sin presentar síntomas de celo para diagnosticar la posible gestación de las mismas, dando como resultado que todas presentaron gestación positiva (71'43%) (*Fig. 29*).

Para confirmar los resultados obtenidos con la primera ecografía realizada, se efectuó una segunda ecografía a los 60 días post-IA, resultando que 1 de las 5 novillas gestantes en la primera ecografía fue diagnosticada no preñada. Como resultado, de las 7 hembras inseminadas, 4 hembras continuaron la gestación tras 60 días, obteniéndose un porcentaje de fertilidad del semen recongelado ST del 57'14%.

Tabla 27. Sincronización e IA con semen re congelado ST en novillas Frisonas.

Novillas sincronizadas (CIDR) (n)	Novillas en celo (%)	Novillas IA (2ª IA, 12 h) (%)	Novillas retorno celo (%)	Novillas gestantes 45 d (%)	Novillas gestantes 60 d (%)
7	7 (100)	7 (100)	2 (28'57)	5 (71'43)	4 (57'14)

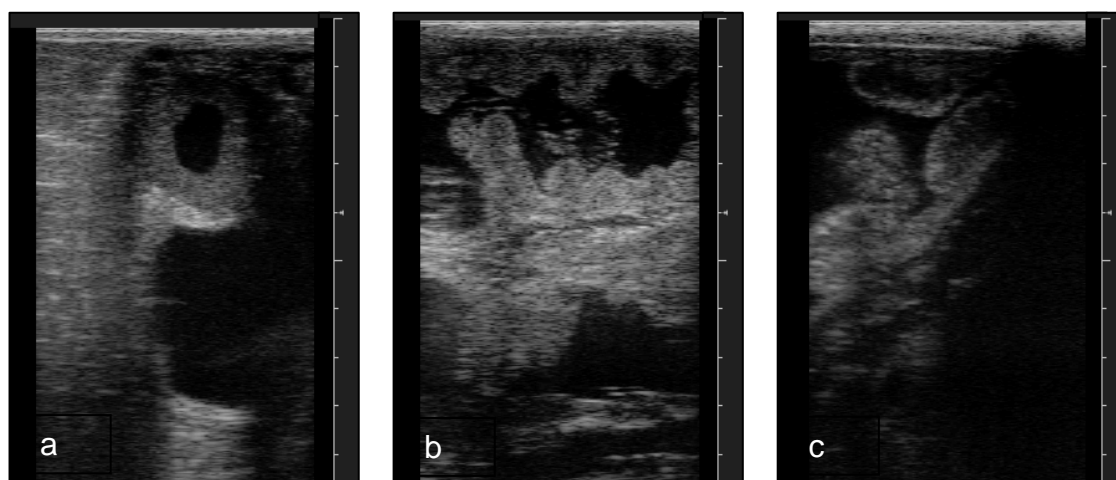


Figura 29. Imágenes ecográficas de novilla gestante (45 d). **a:** Cuerpo lúteo de gestación y vesícula embrionaria; **b, c:** Placentomas y embrión.

5. DISCUSIÓN

5.1. Experiencia 1. Parámetros seminales en toros de raza ML

Muchos autores están de acuerdo en que la conservación *in vitro* debe acompañar a las actividades de la conservación *in vivo* para impedir el proceso de desaparición de las razas animales (Rodero *et al.*, 1994). La utilización de estas dos metodologías en conjunción es aún más necesaria en el caso del ganado bovino, donde la IA con semen descongelado se ha impuesto desde hace ya muchas décadas, cuatro años después de que se descubrieran las bondades del glicerol como crioprotector (Polge *et al.*, 1949).

En el ganado bovino de raza ML, al inicio del programa de conservación racial a finales de la última década del siglo XX, se utilizó la monta natural para obtener descendencia, utilizándose un solo toro propiedad de un criador para fecundar las diferentes hembras que eran transportadas al lugar donde se ubicaba el semental (Peinado *et al.*, 2002a).

Las actividades iniciadas en el seno de la Asociación para la Conservación y Recuperación de la raza bovina ML (COREMUR), hoy conocida como GANACULTURA (Asociación para la Conservación y Divulgación de las Tradiciones Ganaderas de Murcia), propició el inicio de las extracciones de semen asistidas mediante electroeyaculación. De esta manera, se han ido utilizando hasta 13 toros, de los cuales existen unas 7280 dosis que se mantienen en el Banco de Germoplasma de una forma dinámica. Por un lado, se pretende mantener el nº suficiente de dosis seminales de cada toro, y por otro, utilizar dosis seminales para IA dentro del programa de mantenimiento y recuperación de la raza; de este modo, son usadas tanto para el programa de conservación *in vitro* como para el de *in vivo*. El nº de dosis seminales previstas en un Banco de Germoplasma de ganado bovino para mantener la variabilidad de la raza son las correspondientes a 25 toros y 80 dosis seminales por cada uno (Bodó, 1990; Ollivier y Renar, 1995), con lo que todavía quedan algunos años para continuar incrementando la variabilidad genética preservando dosis seminales de toros jóvenes, aunque está prevista la disminución de dosis seminales de cada toro con la puesta a punto de la técnica del sexado de semen, que reducirá a cerca de la mitad los costes derivados del

mantenimiento del Banco de Germoplasma y acelerará, ganando en eficacia, el proceso de recuperación racial (Rath y Johnson, 2008).

Los trabajos realizados por Lömker y Simon (1994), Danchi-Burge *et al.* (2001) y Gandini *et al.* (2007), recomiendan que el semen almacenado en el Banco de Germoplasma proceda de al menos 25 machos sin relación de parentesco entre ellos para mantener el 98% de la heterocigosidad poblacional. Por otra parte, Hiemstra *et al.* (2005) encuentra que este valor es demasiado elevado y difícil de alcanzar, ya que se trata de razas en peligro de extinción y el nº de ejemplares disponible es reducido; lo que sucede con la raza ML.

En los programas de conservación realizados por Crespo García (2003) y Tamargo *et al.* (2009) se recomienda el mantenimiento de un total de 500 dosis seminales por semental. De todos los toros crioconservados en el Banco de Germoplasma, los sementales ML1, ML2, ML3 y ML5 son los únicos que superan este valor. El resto de sementales, excepto el ML13, que sigue dentro del programa de recuperación racial, fueron sacrificados antes de poder realizar más extracciones seminales que pudieran completar el mínimo recomendado.

Por otra parte, la conservación *in vitro* de esta raza no sólo se ha llevado a cabo con la crioconservación del material genético masculino, sino que también existe un Banco de Germoplasma de embriones obtenidos mediante FIV, con un total de 170 embriones, que proporcionarían un número adecuado de futuros descendientes.

Otro método que se ha utilizado para la conservación *in vitro* de la raza bovina ML es la punción folicular ecoguiada, conocida como OPU (*Ovum Pick Up*), que consiste en la obtención de ovocitos mediante punción ovárica de las hembras *in vivo* para después ser empleados en los procesos de maduración, fecundación y producción *in vitro* de embriones. En diciembre de 2012 nació “*Fuensanta*”, la primera ternera de la raza ML obtenida a partir de una serie de técnicas de biotecnología reproductiva como son, la extracción y congelación de semen de toro ML, la extracción de ovocitos de vacas ML donantes

mediante OPU, la producción de embriones *in vitro* mediante MIV-FIV, la vitrificación para su conservación, y su posterior implantación a una vaca receptora de raza Frisona, previamente seleccionada y sincronizada, mediante técnicas de transferencia embrionaria (Astiz *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2013).

El nº de dosis seminales obtenidas de cada eyaculado depende de varios parámetros que no siempre se mantienen homogéneos. El volumen del eyaculado obtenido en algunas razas en peligro de extinción como la raza Serrana de Teruel (Quintín *et al.*, 2013), es inferior al que presentan los toros ML cuando son sometidos a un proceso de electroeyaculación. Los valores promedio de 4 y 5'5 ml para dos toros de la raza Serrana de Teruel son inferiores a los obtenidos en la raza ML, con 8 y 10'7 ml, según se trate de 1º ó 2º eyaculado. Otras razas españolas en la misma situación de riesgo, como es el caso de la Agrupación bovina Morenas del Noroeste, proporcionan unos valores promedio del semen del 1º eyaculado muy poco variable entre la raza Caldelana y Vianesa, con 4'59 ml y 5'85 ml, respectivamente, siendo estos valores para el 2º eyaculado de 5'13 ml y 5'40 ml, respectivamente. El resto de las razas bovinas de esta agrupación tienen valores de volumen seminal intermedio entre los datos señalados (Sánchez *et al.*, 1992). Todos estos valores son también inferiores a los promedios señalados para los toros ML.

Por otra parte, las razas Sayaguesa y Marismeña presentan valores de volúmenes promedio de 5'50 y 5'01 ml, respectivamente, confirmando que estos volúmenes siguen siendo inferiores a los encontrados en los toros ML.

Comparando nuestros datos de volumen con la raza Cachena, esta última presentó unos valores promedio de 4'47 ml, lo que está muy por debajo de los del toro ML. Esto podría explicarse por las diferencias entre razas y también por las diferencias en la cantidad de plasma seminal emitido por las glándulas sexuales accesorias durante la eyaculación (Cole y Cupps, 1984).

Además, según Muiño *et al.* (2006b), los volúmenes seminales encontrados para toros Frisones menores de 3 años y mayores de 3 años fueron de 6 y 9'30 ml, respectivamente.

La concentración espermática de los eyaculados de toros de raza Serrana de Teruel arroja unos valores promedio de 690 a 770 x 10⁶ esp/ml, mientras que en la raza ML, los valores promedio de concentración son de 591'4 y 507'2 x 10⁶ esp/ml para 1º y 2º eyaculado, respectivamente; valores que están por debajo del rango hallado para la raza Serrana de Teruel. Esto es lógico, puesto que la relación concentración/volumen es diferente en el semen del toro ML, y a mayor volumen siempre existe una menor concentración. Aunque como vemos en los resultados, existen respuestas de tipo idiosincrásico en algunos toros en los que se aumenta el volumen y la concentración no disminuye, sobre todo cuando se comparan 1º y 2º eyaculado de algunos donantes.

Los valores promedio de concentración espermática encontrados en razas Caldelana y Vianesa para el 1º eyaculado muestran unos valores de 1440 x 10⁶ y 1370 x 10⁶ esp/ml, respectivamente. Por otra parte, para el 2º eyaculado, los datos en estas mismas razas fueron de 1290 x 10⁶ y 1000 x 10⁶ esp/ml. En todos los casos estos valores son superiores a los referidos en toros ML. Esto es debido a que estas razas presentan un menor volumen y una mayor concentración que en el caso de toros ML.

Las concentraciones referidas para las razas Sayaguesa, Marismeña y Cachena son de 1410 x 10⁶ esp/ml para la 1ª extracción seminal, de 1170 x 10⁶ esp/ml para la 2ª y de 1100 x 10⁶ esp/ml para la 3ª (Sánchez *et al.*, 1992), siendo estas concentraciones también superiores a las de la raza ML.

En la raza de fomento Asturiana de los Valles, se hallaron valores medios de volumen de 5 ml y concentración de 1300 x 10⁶ esp/ml, siendo una vez más el valor del volumen obtenido menor que en el caso de la raza ML y mayor en el caso de la concentración espermática (Muiño *et al.*, 2009).

Según varios autores la baja calidad y concentración espermática también puede estar provocada por el estrés calórico debido a las temperaturas extremas (Rao y Rao, 1975; Gauthier, 1984; Cardozo 2000; Vejarano *et al.*,

2005; Prieto *et al.*, 2007). Gómez y Migliorisi (2007) apuntan que la concentración mínima aceptable es de 500×10^6 esp/ml. La concentración promedio total de la totalidad de los eyaculados de toros ML es de $549'3 \times 10^6$ esp/ml, encontrándose este valor dentro del rango establecido por los autores referidos. Sin embargo, existen valores promedio de la raza ML que de forma individual no alcanzan la media establecida por Gómez y Migliorisi (2007), lo que podría explicarse por una falta de nutrientes derivada de una mala alimentación (generalizada en esta raza por la falta de ayudas económicas) o las condiciones ambientales (Ruiz *et al.*, 2010), en el caso de los sementales a los que se les extrajo semen en la época estival (bajo las temperaturas extremas que se alcanzan en la Región de Murcia durante el verano).

El pH seminal bovino debe variar, según Olivares y Urdaneta (1985), entre 6'4 y 6'9, y según Vera y Muñoz (2005) entre 6'7 y 7, mencionando además que el pH del semen está relacionado tanto con el método de recolección utilizado, como con el manejo en el momento de la recogida seminal (Ruiz *et al.*, 2010). El pH del semen de los eyaculados de la raza ML está cercano a la neutralidad (pH=7) con valores que oscilan entre 6'9 y 7'5, siendo el rango más frecuentemente encontrado de 7'2 a 7'5, hallándose estos valores dentro de los rangos referidos anteriormente (Olivares y Urdaneta, 1985; Vera y Muñoz, 2005). Otros autores apuntan que el pH de semen bovino que se considera normal se encuentra entre 6'2 y 6'8 (Gómez y Migliorisi, 2007), los valores encontrados en el ML son mayores debido posiblemente a la recolección efectuada mediante electroeyaculación.

Existe una gran variabilidad en cuanto a la calidad del semen obtenido mediante electroeyaculación (Lawson *et al.*, 1967). Es decir, los eyaculados de morueco, toro y macho cabrío presentan un volumen más alto, una menor concentración espermática y un mayor pH, que en los obtenidos con VA (Memmon *et al.*, 1986). Ruiz *et al.* (2007) también apuntan que el volumen eyaculado por los sementales está relacionado con el método de recolección utilizado. Esto explicaría las diferencias para estos parámetros seminales entre el ganado ML y el resto de razas autóctonas bovinas.

En el Banco de Germoplasma de la raza ML, las dosis de cada eyaculado extraído por electroeyaculación corresponden a un total de 12 toros, existiendo una gran variabilidad entre los diferentes sementales utilizados, e incluso entre los pertenecientes al mismo toro, siendo 136, la media ponderada del nº de dosis seminales por eyaculado; con un valor máximo de 226 dosis, y mínimo de 34. Hay que tener en cuenta que cada dosis seminal contiene 40×10^6 esp/dosis, y que además debemos considerar la disponibilidad que se tiene de estos sementales bajo las condiciones que exigen sus propietarios.

Según Quintín *et al.* (2013), en la raza Serrana de Teruel, la media de dosis por eyaculado, de dos toros de la raza, obtenidos por electroeyaculación fue de 111, valor que no difiere del obtenido en la raza ML a pesar de la diferencia en el número de toros estudiados. Aunque también los valores son muy dispares, y no son dependientes de la edad de los toros, con 85 dosis para toros de 24 meses de edad y 137 dosis por eyaculado para toros de 18 meses de edad en la raza bovina Serrana de Teruel. También hay que considerar que en la raza Serrana de Teruel la concentración espermática en las dosis seminales es de 25×10^6 esp/dosis, frente a los 40×10^6 esp/dosis utilizados en las dosis de la raza ML.

Los disparidad de valores encontrados entre los diferentes donantes de la misma raza podría explicarse con los trabajos de Haugan *et al.* (2005) y Al-Makhzoomi *et al.* (2008), en los que se realizaron sendas revisiones sobre los efectos del semental, época de extracción, raza, medios utilizados en la congelación, etc. sobre los índices de fertilidad, y en los que se encontraron sensibles diferencias significativas entre individuos.

5.2. *Experiencia 2. Valoración de la calidad del semen congelado y recongelado*

5.2.1. Motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos en semen congelado y recongelado

Uno de los parámetros más importantes de un análisis seminal es la motilidad espermática, que medida de forma subjetiva por una persona experimentada supone un método barato y eficiente (Hidalgo *et al.*, 2005).

El valor promedio obtenido en la raza ML para la motilidad individual en semen congelado fue de 4'08; para el semen recongelado sometido a un proceso previo (CT) fue de 2'93, y para el semen recongelado al que no se le realizó tratamiento previo (ST) de 3'58. Por otra parte, los promedios referidos al semen congelado, recongelado CT y recongelado ST para el parámetro *porcentaje espermatozoides vivos* fueron 60, 21 y 39'3%, respectivamente.

Según Sánchez *et al.* (1992), los valores hallados para la motilidad individual en el 1º y 2º eyaculado de semen fresco de toros de razas autóctonas en peligro de extinción fueron de: 1'96 y 2'80 para la raza Alistano Sanabresa; 1'87 y 2'63 para la raza Cachena; 2'02 y 2'88 para la raza Caldelana; 2'17 y 2'87 para la raza Vianesa; y 2'28 y 2'90 para la raza Sayaguesa. Por otra parte, en la raza ML se encontraron valores promedio en semen congelado de 4'08. No se tienen datos de valores de semen fresco para esta raza porque la extracción se practica en la granja de origen, careciendo estos lugares de medios adecuados, por lo que solamente se realiza un acondicionamiento eficaz y el transporte del semen al laboratorio para su posterior congelación. A pesar de tratarse de valores referentes a semen fresco por una parte, y de semen congelado por otra, siguen siendo bastante mejores los resultados obtenidos en el caso de la raza ML. Para esta raza se obtuvieron, además, valores promedio de motilidad espermática en semen recongelado ST de 3'58, y para semen recongelado CT de 2'93, siendo este último valor más cercano a los referidos por Sánchez *et al.* (1992). Por otro lado, para la raza Marismeña se encontró un valor promedio para la motilidad

masal de 3'66, aunque la motilidad individual y masal no son comparables entre sí, aportan información sobre la actividad del semen recolectado.

Muiño *et al.* (2009), dentro del estudio de caracterización del semen de toros en la raza Asturiana de los Valles, encontraron unos valores de porcentaje de espermatozoides vivos en semen recién extraído sin congelar del 94'7%. Por otra parte, el valor medio hallado en la raza Marismeña fue del 77'31% (Vallecillo, 2011). Como ya hemos indicado anteriormente, en la raza ML, los valores obtenidos fueron 21, 39'3 y 60% para semen recongelado CT, recongelado ST y congelado, respectivamente; lo que nos indica que este último dato con respecto al semen congelado es inferior a los hallados para semen fresco en las razas Asturiana de los Valles y Marismeña y que los valores para semen recongelado CT y ST son sensiblemente inferiores debido a los procesos a los que este tipo semen es sometido.

Como resultado final a la descongelación de las dosis seminales se obtiene una pérdida de vitalidad y motilidad espermática, aumento de morfoanomalías, daño en acrosomas y pérdida de fertilidad (Chauhan *et al.*, 1994, Correa *et al.*, 1996).

Los datos de motilidad espermática en bovino obtenidos por Arav *et al.* (2003) tras la descongelación del semen recongelado muestran unos datos de 50% frente a un 75% para el congelado, resultados muy próximos a los obtenidos en el presente estudio.

Los resultados reportados sobre semen crioconservado por Anzar *et al.* (2002) para el porcentaje de espermatozoides vivos en la especie bovina fueron del 80-90%. En nuestro caso, los valores obtenidos para este parámetro fueron menores para todos los toros estudiados y en todos los métodos de congelación utilizados, obteniendo unos valores máximos y mínimos para el semen congelado del 65 y 50%, para el semen recongelado ST de 58'75 y 21'25%, y del 50% y 4'75% para el semen recongelado CT. Estas diferencias podrían ser debidas a la calidad seminal inicial en el semen fresco, a una

cuestión racial, e incluso a la consanguinidad existente entre los sementales sometidos a estudio.

Hollinshead *et al.* (2004b) efectuaron un estudio en el que se incluye la investigación del efecto del procesamiento antes de la recongelación espermática en la especie bovina sobre las características espermáticas *in vitro*. Uno de los parámetros que evaluaron fue el de la motilidad. Los espermatozoides preparados para el sexado incrementaron su motilidad tras el mismo y mantuvieron alta motilidad y velocidad tras la incubación, recongelación, descongelación e incubación. Mencionan, además, en uno de sus estudios que algún componente del proceso de centrifugación podría afectar de forma negativa la congelación de espermatozoides bovinos, causado por una disminución en la motilidad. Dentro de los ensayos realizados en la raza ML, también se realizaron dos centrifugaciones previas a la realización de la recongelación CT. La realización de este proceso podría ser la causa de la baja motilidad espermática obtenida tras la recongelación espermática.

Saragusty *et al.* (2009) realizaron la congelación y recongelación espermática en semen de toro Holstein, y los resultados que obtuvieron sobre el parámetro motilidad espermática para la doble congelación fue inferior significativamente a la obtenida para la congelación. También hallaron diferencias significativas entre los sementales cuando se evaluó la motilidad a la descongelación tras la congelación convencional (50-80%) y congelación doble (20-40%). Estos datos concuerdan una vez más con los encontrados en nuestro trabajo.

Underwood *et al.* (2009a) llegan a la conclusión, tras un estudio en semen bovino, de que mientras que el semen que ha sido sexado mejora la funcionalidad del semen congelado, la recongelación espermática produce una disminución en la motilidad espermática; hecho que vuelve a confirmar nuestros resultados.

En los trabajos realizados por Arav *et al.* (2002) en los que se llevó a cabo la congelación de grandes volúmenes de semen mediante una técnica

novedosa, se obtuvieron unos resultados de motilidad espermática de $75 \pm 5\%$ tras la 1ª congelación; y de $50 \pm 5\%$ tras la 2ª congelación espermática. Disminución en la motilidad espermática que también se produce tras la recongelación espermática de dosis seminales en toros ML.

Underwood *et al.* (2010b) apuntan a que la baja fertilidad del semen recongelado podría ser debida a la disminución de la motilidad espermática y su velocidad, lo que reduciría el nº de espermatozoides viables presentes en el oviducto en el momento de la ovulación. Estudios *in vitro* realizados previamente por estos mismos autores, para conocer la funcionalidad espermática del semen congelado-sexado y recongelado en bovinos mostraron una reducida motilidad (Underwood *et al.*, 2009a). Por otro lado, en el ensayo realizado por Saragusty *et al.* (2009) se obtuvieron resultados de motilidad espermática post-congelación superiores a los obtenidos tras la recongelación espermática, tras lo cual, se realizó IA en varias vacas y novillas utilizando ambos métodos y empleando el semen de cuatro sementales, no hallándose diferencias significativas en los porcentajes de preñez, salvo en uno de los toros, si se comparaban ambos métodos de congelación. Estos resultados contradictorios sugieren que tienen que ser otros aspectos los que se encuentren implicados en la baja fertilidad del semen recongelado.

McCue *et al.* (2004b) realizaron un experimento en el que se recongeló semen equino, obteniéndose unos resultados de motilidad espermática que pasaron de 64'2% en la congelación a 45'7% tras la recongelación espermática, experimentándose así una disminución en la motilidad espermática, al igual que sucede en nuestros ensayos. En un segundo experimento llevado a cabo por estos mismos autores, en el que se congeló y recongeló semen bovino, se observó que el semen congelado presentó una motilidad sustancialmente mayor que la obtenida tras descongelar semen recongelado, resultados que se ajustan a los nuestros en el caso de algunos toros ML utilizados en este estudio (McCue *et al.*, 2005).

Estos mismos autores, en un estudio sobre semen equino, observaron que la motilidad espermática disminuyó significativamente de valores de $91'8 \pm$

3'1% antes de la congelación, a $64'2 \pm 7'7\%$ después de la 1ª congelación, y $45'7 \pm 10'4\%$ tras la recongelación. Este estudio demuestra que la recongelación espermática en la especie equina conserva aproximadamente el 70% de la motilidad tras la 1ª descongelación. Además, llegan a la conclusión de que la dilución del semen antes de la recongelación espermática podría permitir la redistribución de una única pajuela de 0'5 ml en cientos de pequeñas pajuelas para su futuro uso en reproducción asistida (McCue *et al.*, 2004b).

También se ha realizado la recongelación espermática en macho cabrío, llegando a la conclusión los autores de esta experiencia, de que el semen de macho cabrío puede ser sometido a una doble congelación sin presentar disminución en la motilidad espermática (Carwell *et al.*, 2010), hecho que se contrapone a los resultados obtenidos en la especie bovina.

En la especie humana, un estudio realizado por Bandularatne y Bongso (2002) sobre congelación y recongelación de semen demostró que no hubo diferencias significativas en los porcentajes de motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y morfoanomalías. Sin embargo, sí que se constató una significativa reducción de la motilidad y del porcentaje de espermatozoides vivos entre cada descongelación. Este semen recongelado, hasta en dos ocasiones, fue capaz de fecundar mediante ICSI ovocitos de hámster. Estos resultados coinciden con los nuestros, tanto por la bajada en la calidad espermática entre la 1ª y 2ª descongelación, como en la capacidad fecundante de los espermatozoides tras la recongelación espermática, aunque en nuestro caso se trate de IA. Estos datos coinciden con los obtenidos por Kelly *et al.* (2010), en los que tras la recongelación de espermatozoides humanos, también se experimentó una disminución significativa en la motilidad espermática.

Otro estudio realizado en espermatozoides humanos utilizó la recongelación empleando N₂L (Sidney y Sandro, 2004). Los resultados que se observaron en parámetros como motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos fue una significativa bajada en la calidad de los mismos entre la 1ª y 2ª descongelación, lo que confirma una vez más nuestros resultados, a pesar de no tratarse de la misma especie ni de igual proceso de congelación seminal.

Verza y Esteves (2004) efectuaron un trabajo sobre la viabilidad de la recongelación de espermatozoides humanos mediante la utilización de N₂L, observando una significativa bajada en la calidad espermática entre la 1ª y la 2ª descongelación. La motilidad total pasó de 42% a 22'5%, la motilidad progresiva de 34% a 9'5% y el porcentaje de espermatozoides vivos de 45% a 20%. En otro trabajo sobre recongelación en semen humano, se observó que la motilidad experimentó una disminución importante con cada descongelación (Leffler y Walters, 1996). En nuestro estudio, los datos que obtuvimos referidos a motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos siguen la misma tendencia a los obtenidos por Verza y Esteves (2004), es decir, los valores derivados de las recongelaciones fueron peores que los obtenidos de la congelación. Coincidiendo también los resultados de este estudio con la disminución de la motilidad tras la recongelación espermática encontrada por Leffler y Walters (1996) en semen humano.

5.2.2. Test de resistencia espermática en semen congelado y recongelado

Un estudio realizado por Underwood *et al.* (2009a) sobre las características del semen congelado bovino tras el sexado, recongelación y descongelación (0, 2 y 4 h post-descongelación a 37°C) o post-sexado a 15 ó 37°C durante 30 y 24 h, respectivamente, fue comparado con el semen congelado-descongelado no sexado y con semen no sexado bajo dos procedimientos de crioconservación (0, 2 y 4 h). El semen congelado-descongelado y sexado mantenido a 15 ó 37°C tuvo mayor motilidad progresiva, velocidad, función mitocondrial, viabilidad e integridad del acrosoma que el grupo que fue congelado y no sexado, aunque con análoga motilidad a las 0 y 2 h de incubación. En nuestro estudio sobre la resistencia espermática para el estudio de la motilidad individual y el porcentaje de espermatozoides vivos, se observó que para cada uno de los sementales analizados, el tiempo (h) que resistieron los espermatozoides con relación a estos parámetros fue menor cuanto mayor fue el daño recibido, resultado coincidente con el obtenido por Underwood *et al.* (2009a).

En el trabajo realizado por Saragusty *et al.* (2009), en el que se realizó un estudio sobre congelación y recongelación de semen de toros de raza Holstein, se mantuvo el semen a 37°C durante 3 h, obteniendo unos resultados de motilidad a las 0 h para semen congelado de 61'79%, y 33'21% para el semen recongelado; y unos resultados de motilidad a las 3 h de incubación a 37°C para el semen congelado de 50'57% y 22'14% para el semen doblemente congelado. Así, los resultados obtenidos muestran una disminución en los porcentajes de motilidad espermática para semen recongelado, tanto para la motilidad a las 0 h como a las 3 h. En los resultados que se obtuvieron de en nuestro estudio para el test de resistencia espermática a 37°C para la motilidad individual, los valores para semen congelado fueron mayores que los obtenidos para semen recongelado (ST y CT). Por otra parte, los resultados del test de resistencia muestran que la disminución en la motilidad individual es directamente proporcional al tiempo de incubación, lo que ocurre también con la recongelación, al igual que los resultados de Saragusty *et al.* (2009).

Por otra parte, en un estudio realizado por De Graaf *et al.* (2009) en semen de carnero en el que se comparó semen sexado a partir de semen fresco y semen sexado a partir de semen congelado, y que posteriormente fue recongelado, resultó en una marcada disminución de la motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y actividad mitocondrial tras 6 h de incubación a 37°C.

En nuestro trabajo, los resultados obtenidos en cuanto a resistencia térmica a 37°C respecto al parámetro motilidad individual en semen congelado, fue que éstos permanecieron móviles un máximo de 9 h (ML3) y un mínimo de 4 h (ML2 y ML11). Para los espermatozoides recongelados ST, se halló una duración máxima de 8 h (ML3) y mínima de 3 h (ML11). Y por último, los espermatozoides recongelados CT permanecieron móviles un máximo de 5 h (ML3) y un mínimo de 1 h (ML2 y ML11). Estos resultados presentan igual tendencia que los reportados por Underwood *et al.* (2009a), Saragusty *et al.* (2009) y De Graaf *et al.* (2009), en cuanto a la disminución en la motilidad espermática en el tiempo, aunque también se observa una disminución progresiva de la duración de la motilidad espermática cuanto mayor es el tratamiento al que han sido sometidos los espermatozoides.

Del mismo modo, los resultados de resistencia térmica para el porcentaje de espermatozoides vivos resultó seguir el mismo patrón de comportamiento que para el parámetro motilidad individual, obteniéndose en el caso de semen congelado una duración máxima de 9 h (ML3) y mínima de 3 h (ML2). Para el semen recongelado ST una duración máxima de 8 h (ML3) y mínima de 3 h (ML11), y por último, para semen doblemente crioconservado CT se observó un máximo de 5 h (ML3) y un mínimo de 1 h (ML2 y ML11). Así, podemos confirmar la disminución de estos dos parámetros seminales bajo condiciones térmicas en el tiempo y bajo la influencia de determinados tratamientos por los que los espermatozoides resultan claramente afectados.

5.2.3. Estudio de la integridad de la membrana espermática en semen congelado y recongelado

Es conocido que durante la crioconservación se producen una serie de hechos perjudiciales para la célula espermática, tales como la formación de cristales de hielo o la variación en la presión osmótica (Mazur, 1984a,b). Sin embargo, se han descrito otros factores que también resultan perjudiciales como son los daños oxidativos, la fase de transición en el plasmalema, los envejecimientos prematuros, los cambios en la capacitación (Watson, 2000), el aumento en la proporción de espermatozoides con acrosomas dañados (Medeiros *et al.*, 2002), además de alteraciones en la membrana plasmática; todos ellos en su conjunto afectan a la integridad y viabilidad del espermatozoide (Martín *et al.*, 2004).

Los espermatozoides de carnero (Hollinshead *et al.*, 2004a; De Graaf *et al.*, 2009) y de toro (Hollinshead *et al.*, 2004b) pueden ser congelados, sexados y recongelados, y aún así mantener la integridad funcional de la membrana (Underwood *et al.*, 2008), lo mismo ocurre en la especie caprina (Carwell *et al.*, 2010), resultados que no coinciden con los de nuestro trabajo, puesto que la integridad de la membrana se ve disminuida cuando el semen es congelado por una 2^a vez.

Por otra parte, en otras especies como en la equina también se ha estudiado la viabilidad de la membrana espermática en semen recongelado encontrándose una disminución de esta viabilidad tras la 2ª congelación espermática medida mediante tinción con IP (McCue *et al.*, 2004a), resultados que coinciden en este caso con los referidos en nuestro estudio.

La integridad funcional y estructural de la membrana espermática puede ser evaluada mediante fluorocromos, lo que facilita la predicción de la capacidad fecundante de un eyaculado (Vallecillo, 2011).

De los resultados de nuestro estudio se deriva que la integridad de membrana, analizada mediante tinción E-N e IP, resulta menos dañada en el caso del semen congelado, seguido del semen recongelado ST, en todos los toros estudiados. La recongelación espermática CT produjo un daño de integridad de membrana mayor que la congelación y la recongelación ST, de lo que se deduce que el aumento en el porcentaje de espermatozoides con membrana dañada fue mayor cuanto mayor fue el tratamiento al que fueron sometidos los espermatozoides.

5.2.4. Estudio de los acrosomas en semen congelado y recongelado

El acrosoma, como es sabido, es fundamental para la fecundación, pero puede llegar a presentar alteraciones severas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación. Así, se ha descrito que una alta proporción de daños en el acrosoma suele estar acompañado de una baja fertilidad (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Según Martín *et al.* (2004), la reacción acrosómica es uno de los mayores daños que se producen dentro del proceso de crioconservación espermática. Cuando Saacke y Marshall (1968) realizaron el estudio de semen congelado e incubado a 37°C llegaron a la conclusión de que existía una mayor relación entre el nº de acrosomas intactos y la fertilidad que entre esta última y la motilidad.

En nuestro estudio, los valores promedio para el porcentaje de acrosomas con membrana dañada fue de 38'56% para semen congelado,

58'65% para semen recongelado CT y 49'11% en semen recongelado ST. Así, el rango de valores encontrado fue de 44 - 23% para semen congelado; 80'3 - 32'7% para semen recongelado CT y 76'6 - 22% para semen recongelado ST. Underwood *et al.* (2009a) obtuvieron unos valores de integridad del acrosoma para semen bovino recongelado y sexado tras incubación de 4 h a 37°C bastante altos ($77'5 \pm 1'3\%$). En nuestro estudio, de forma general, el porcentaje de acrosomas dañados experimentó un aumento tras la recongelación espermática, mayor cuanto mayor fue el tratamiento al que fueron sometidos los espermatozoides, a excepción del toro ML9, en el que el porcentaje de acrosomas íntegros fue mayor en el caso del semen recongelado. Estas diferencias se podrían explicar por el proceso de sexado, ya que según estos autores, no disminuye el porcentaje de acrosomas íntegros tras la recongelación espermática (Underwood *et al.*, 2009a).

En posteriores estudios realizados por Underwood *et al.* (2010b), también obtuvieron en semen de toro doblemente congelado, unos valores aceptables de acrosomas con membrana íntegra. De hecho, se realizó un análisis seminal *in vitro* en el que se llevó a cabo la recongelación espermática del semen que había sido sexado, observándose que la mayoría de las características seminales analizadas habían experimentado un descenso, a excepción de la integridad del acrosoma y la función mitocondrial. Estas diferencias con respecto a nuestros resultados, podrían ser explicadas por las diferentes condiciones de manejo.

En un ensayo realizado por Hollinshead *et al.* (2004a), en el que se realizó recongelación espermática de carnero, se encontró que los acrosomas intactos hallados en el semen que fue sexado y recongelado fueron menores. Del mismo modo, en un trabajo llevado a cabo por estos mismos autores en semen de toro, en el que también se realizó sexado y recongelación espermática, se obtuvo una similar proporción de acrosomas intactos en comparación con el anterior estudio (Hollinshead *et al.*, 2004b).

De forma general, podemos decir que la proporción de espermatozoides con acrosomas dañados fue menor en el semen congelado que en el semen

recongelado, siendo mayores los daños provocados en el semen recongelado CT, a excepción de ML9, en el que no se observó incremento en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado. La baja proporción de espermatozoides con acrosoma dañado, que difiere de nuestros resultados, podría ser debido al proceso de sexado espermático al que son sometidas todas las muestras seminales en los trabajos anteriormente citados.

5.2.5. Estudio de la cromatina espermática en semen congelado y recongelado

En los estudios realizados por Kelly *et al.* (2010) para conocer el efecto de la congelación-descongelación repetida sobre la fragmentación del ADN espermático humano, se vio que la fragmentación del ADN fue aumentando conforme se realizaban cada uno de los ciclos de congelación; sin embargo, las muestras a las que no se les aplicó manipulación alguna después de cada ciclo, obtuvieron resultados mucho mejores que aquellas muestras que sí resultaron manipuladas. Podría decirse que al igual que en nuestro trabajo, se realizó una recongelación CT y otra ST. Sin embargo, a diferencia del trabajo realizado por Kelly *et al.* (2010), en cada uno de los ejemplares en los que se realizó nuestro estudio, no se encontraron variaciones significativas en el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada entre semen congelado y recongelado, tanto si éste fue CT ó ST, lo que podría explicarse si suponemos que el tratamiento al que fueron sometidos los espermatozoides en el estudio de Kelly *et al.* (2010) resultó más agresivo que el que utilizamos nosotros, además de tratarse de espermatozoides de especies diferentes.

Los resultados de nuestro trabajo en cuanto al daño producido en el ADN espermático, estudiado mediante tinción de azul de toluidina, en semen congelado y recongelado, no presentan diferencias significativas en cuanto a los valores hallados entre las congelaciones y las recongelaciones para cada uno de los sementales empleados en nuestro estudio. De hecho, los promedios de todos los valores en cada toro resultan ser muy similares.

5.2.6. Estudio de morfoanomalías espermáticas en semen congelado y recongelado

Uno de los principales estudios que ha de realizarse a un eyaculado para conocer su calidad espermática es el morfológico, que está basado en la relación directa que hay entre la proporción de espermatozoides anómalos, el tipo de anomalía morfológica y su relación con la fertilidad *in vivo* de los sementales (Hidalgo *et al.*, 2005).

Según los datos estudiados sobre formas anormales en el semen congelado y recongelado perteneciente a toros de raza ML, la media de los valores máximos encontrados fueron 10'31% para semen congelado, 7'87% para semen recongelado CT y 8'45% para semen recongelado ST. Además, las formas anormales más frecuentes han sido las "colas en látigo", con un valor medio para todos los toros estudiados de 10'31% en semen congelado, 6'68% en semen recongelado CT y 8'23% para semen recongelado ST. En menor medida se encontraron "cabezas sueltas", "colas sueltas", "colas en ovillo", "cabezas dobladas", "microcabezas" y "cabezas redondas".

Ruiz *et al.* (2007) apuntan que cuando el semen presenta más de un 15% de anomalías morfológicas en los espermatozoides, la fertilidad disminuye. Los porcentajes obtenidos para la raza ML han sido inferiores a los descritos por estos autores como valores negativos, tanto para el semen congelado como para el recongelado.

Según Verza y Esteves (2004), durante el estudio de la recongelación en espermatozoides humanos mediante N₂L, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal tanto en la 1ª como en la 2ª descongelación fue del 5%. Los resultados en el toro ML también muestran, en la mayor parte de los casos, que no existen diferencias relevantes en cuanto a porcentaje de morfoanomalías encontradas entre la congelación y la recongelación espermática para cada uno de los sementales utilizados, salvo en uno de los sementales estudiados (ML3). Los datos aportados respecto al porcentaje de formas anormales por Muiño *et al.* (2009) para toros Asturianos de los Valles,

fueron de un 9'7%. Los resultados obtenidos para la raza ML muestran valores que se aproximan a ese dato.

Por otra parte, en la especie caprina se ha estudiado la morfología de las células espermáticas tras un doble ciclo de congelación espermática, no encontrándose cambios en este parámetro (Carwell *et al.*, 2010).

Söderquist *et al.* (1997) obtienen unas medias de porcentaje de morfoanomalías en semen fresco que oscilan entre 6 y 8'3% en toros lecheros de raza sueca. Además, señalan que en esta raza, la mayor cantidad de formas anormales estaban en la cabeza (6%), y del resto de las anomalías (de cola, pieza media, gota citoplasmática) se obtuvieron valores medios de 1-2%. Según nuestros datos, el porcentaje de morfoanomalías fluctúa entre 0 y 16'62%, respectivamente; además de corresponderse el valor máximo con anomalías asociadas a la cola del espermatozoide, lo que difiere de lo encontrado por Söderquist *et al.* (1997). Esto podría explicarse por las diferencias raciales y sobre todo, a que en el toro ML los valores se refieren a semen congelado y recongelado, lo que explicaría el aumento en el nº de anomalías espermáticas encontradas.

Por otra parte, Evans y Maxwell (1987) afirman que el semen no debe de superar el 15-20% de formas anormales para ser considerado normal y presentar buena capacidad fecundante. Oettlé (1993) también reporta que cuando la proporción de espermatozoides morfológicamente normales es inferior al 60%, la fertilidad disminuye. Según estas afirmaciones, nuestros resultados son positivos, puesto que no se supera el 16'62% de morfoanomalías, en el peor de los casos, más aún si se tiene en cuenta que se trata de un valor encontrado para semen recongelado.

Según Barth *et al.* (1992) la fertilidad de los sementales no se ve afectada negativamente si la proporción de cabezas sueltas es baja. Según nuestros resultados, los sementales ML5 y ML11 obtuvieron los porcentajes más elevados en esta anomalía espermática; con valores para ML5 de 3'5% en semen congelado, 9'25% en semen recongelado CT y 5'37% en semen

recongelado ST. Para ML11, los datos fueron 10'5% para semen congelado, 7'37% para semen recongelado CT y 10'5% para recongelado ST. Aún así, no se trata de valores demasiado elevados, con un promedio para la morfoanomalía "cabezas sueltas" de todos los sementales de 3'46% para semen congelado, 4'2% para semen recongelado CT y 4'3% para semen recongelado ST. En los resultados obtenidos para todo el estudio espermático, ML11 posee los peores resultados, lo que corroboraría lo propuesto por Barth *et al.* (1992).

Álamo-Santana (2007) indica que el procedimiento derivado de la técnica utilizada puede provocar anomalías como roturas en las cabezas y colas, así como formas anormales de los espermatozoides que pueden ocultar el resultado real, obteniéndose así un número alto de morfoanomalías. En nuestro estudio se realizan hasta dos centrifugaciones de los espermatozoides para semen recongelado CT, no encontrándose diferencias significativas entre los resultados obtenidos para semen congelado, recongelado CT y recongelado ST.

En estudios realizados sobre morfologías seminales en toros de diferentes edades, se observó que la edad influía sobre las anormalidades morfológicas de los espermatozoides. De hecho, toros de 36 a 48 meses de edad, considerados jóvenes, según Ruiz *et al.* (2010), presentaron una morfología espermática de mayor calidad que la presentada por los espermatozoides de toros de más de 72 meses o menores de 36 meses de edad (Vilakazi y Webb, 2004). En el ganado ML de este estudio no se han encontrado diferencias en cuanto a la edad. Los toros considerados adultos y los jóvenes presentan valores promedio de alteraciones morfológicas en los espermatozoides por debajo del 20%, existiendo ejemplares que presentan alteraciones de colas en látigo, cabezas sueltas y colas en ovillo en mayor proporción, independientemente de su edad.

De forma global, podemos concluir que los porcentajes de morfoanomalías obtenidos para la raza ML no resultan elevados dada la consanguinidad de la raza, y que en general tampoco existen diferencias

significativas entre los espermatozoides con formas anormales en semen congelado, recongelado CT y recongelado ST, tanto en una determinada morfoanomalía como dentro del mismo individuo.

5.3. Experiencia 3. Uso de la IA para la valoración de la fertilidad del semen recongelado

El uso de la IA ha contribuido a la mejora genética, principalmente en las razas ganaderas de interés productivo y económico. En el caso de las razas en peligro de extinción, esta técnica ha jugado un papel determinante en su conservación y difusión. Pero para el éxito de la IA es necesaria una calidad óptima del eyaculado, de hecho, existe una correlación entre la capacidad fecundante real del semen y la calidad a nivel laboratorial del mismo, aunque no se han realizado hasta el momento estudios suficientes como para determinar que la calidad seminal nos asegure una gestación viable (Vallecillo, 2011).

La utilización del semen crioconservado de razas en peligro de extinción (en nuestro caso, doblemente congelado) para la IA de hembras pertenecientes a razas de fomento, nos puede llevar a conocer la fertilidad real de nuestras dosis recongeladas.

La investigación mediante la utilización real de semen criopreservado con hembras de poblaciones no amenazadas, puede jugar un papel crucial en el conocimiento de la fertilidad real de nuestros Bancos de Germoplasma; de esta manera, se puede conocer el estado de la fertilidad del semen de forma actualizada, parámetro que consideramos muy interesante a la hora de desarrollar programas de recuperación y multiplicación de una determinada raza en caso de catástrofe.

De hecho, Maxwell *et al.* (2007b) llegaron a la conclusión, según sus resultados, de que el semen bovino podía ser congelado y descongelado, seguido de un nuevo ciclo de congelación-descongelación, además de la

posibilidad de utilizar la recongelación espermática para la realización de programas de IA.

El éxito de la recongelación de espermatozoides de toro resultando en hembras preñadas tras la IA fue reportado por primera vez por Arav *et al.* (2002), aunque no estudió la calidad seminal antes y después de la 2ª congelación. Estos autores realizaron la IA de un grupo de vacas con semen congelado y de otro grupo de vacas con semen recongelado, dando como resultado del 1º grupo un ratio de preñez de 45'5% (56/123) y de 44% (47/105) para el 2º, no resultando haber diferencias apreciables entre ellos. En nuestro ensayo se obtuvo un 57'1% para la IA con semen recongelado de toro ML, dato que supera al obtenido por Arav *et al.* (2002) y que podría explicarse por la gran diferencia en el nº de hembras utilizadas para el ensayo.

Sin embargo, la primera vez que se tuvo constancia del nacimiento de descendencia mediante IA con semen congelado-sexado-recongelado en la especie bovina, fue a partir de un trabajo realizado por Underwood *et al.* (2010b), en el que se realizó la IA de varias novillas utilizando semen que no había sido sexado (control), semen congelado-sexado-recongelado y semen refrigerado-sexado-recongelado, perteneciente a dos toros diferentes. Se observó una diferencia significativa en el nº de hembras gestantes obtenido para cada uno de los toros, y también en la probabilidad de obtener descendencia utilizando el semen no sexado (control) (57'4%) comparado con el semen refrigerado-sexado-recongelado, y el congelado-sexado-recongelado (4'1%). Los resultados demostraron que el semen sexado y recongelado era capaz de fecundar *in vivo*, y que por tanto, podía ser utilizado para el sexado espermático cuando las instalaciones para llevar a cabo esta técnica se encontraran a gran distancia. Frijters *et al.* (2009) reportan que la baja fertilidad hallada en dosis de semen que ha sido sexado podría ser debido a las bajas dosis de semen utilizado para IA, ya que el semen que ha sido sexado tiene una baja fertilidad. Éste podría ser el motivo de la baja fertilidad obtenida cuando se utilizaron las dosis sexadas y recongeladas, ya fueran provenientes de semen refrigerado o congelado.

De hecho, Underwood *et al.* (2010b) realizaron un ensayo en el cual efectuaron IA de siete novillas con semen de toro sexado y recongelado, obteniéndose la confirmación de que una de las novillas estaba gestante (14'3%) y produciéndose además, el nacimiento de un ternero; hecho que podría crear con el tiempo una técnica rutinaria. Aunque este dato es inferior con respecto al obtenido en este estudio con semen recongelado de toro ML, nos indica que en cualquiera de las circunstancias de manejo seminal, se puede obtener descendencia con unas precauciones mínimas en la manipulación del semen.

Saragusty *et al.* (2009) realizaron la IA de 1836 vacas de la raza Holstein con semen recongelado, obteniendo un porcentaje de hembras preñadas del 28'05%. En nuestra experiencia, se inseminaron artificialmente siete novillas de raza Frisona con semen recongelado proveniente de uno de los sementales utilizados para este estudio. Al final de la experiencia, el porcentaje de novillas que quedaron gestantes tras 60 días post-IA fue de 57'1%. Aunque después del 1º diagnóstico ecográfico de la gestación efectuado a los 45 días post-IA, fueron detectadas gestantes 5 de las 7 novillas utilizadas para el estudio. Es posible que fenómenos de reabsorción embrionaria se produjesen en este intervalo de tiempo (de 45 a 60 días). Además, otros autores han corroborado la capacidad fecundante de los espermatozoides de toro recongelado mediante FIV, obteniendo resultados satisfactorios (McCue *et al.*, 2005), lo que reafirma también los resultados positivos que hasta ahora se están dando sobre la recongelación espermática.

Underwood *et al.* (2010a) realizaron la IA de novillas utilizando semen recongelado previamente sexado, dando como resultado un pequeño nº de hembras que quedaron gestantes. Sin embargo, no se llegó a producir ningún nacimiento derivado de las IAs (Underwood *et al.*, 2009a). Estos autores explican este hecho sugiriendo que tras la 1ª congelación, aproximadamente la mitad de la población espermática no sobrevive, mientras que el resto, normalmente reduce su funcionalidad espermática (Watson, 2000) debido a los efectos negativos de la congelación-descongelación sobre algunos parámetros necesarios para el éxito de la fecundación (Celeghini *et al.*, 2008; Watson,

1995). El daño producido aumenta si el semen es expuesto a una 2ª congelación, provocando mayor reducción en la calidad de los parámetros de calidad seminal (Underwood *et al.*, 2009a).

Schenk *et al.* (2009) sugieren que la IA tardía con semen sexado (18-24 h tras el comienzo de la ovulación) puede incrementar el porcentaje de gestación comparado con IA 12 h después del estro, llegando a la conclusión de que el semen bovino sexado podría tener una esperanza de vida funcional menor que el semen bovino no-sexado. Teniendo en cuenta que el semen recongelado tiene una baja longevidad *in vitro*, estos autores apuntan que siendo así, esta baja longevidad y velocidad espermática se podría compensar mediante IA en el cuerno uterino, cerca del momento de la ovulación o con la IA de grandes dosis de esperma.

Underwood *et al.* (2010c) realizaron, en uno de sus trabajos, la IA de 7 novillas con semen sin sexar y congelado; otras 7 novillas con semen que fue congelado, sexado y recongelado; y otras 7 novillas con semen congelado y sexado; los resultados obtenidos fueron de 57'1% novillas gestantes y que obtuvieron descendencia en el 1º caso (4/7); 14'3% para el 2º caso, y ninguna novilla gestante tras el 3º tratamiento. Estos mismos autores apuntan que el nacimiento de una ternera tras IA con semen congelado, sexado y recongelado, muestra posibilidades en el futuro, sin embargo, los daños producidos durante la 2ª congelación sobre la calidad espermática reduce la probabilidad de fecundación bajo condiciones normales de campo. Sugieren además, que la producción de embriones *in vitro* podría ser una mejor alternativa para la utilización de semen tan manipulado, incluso después de la recongelación espermática, pues elimina el problema de la baja velocidad espermática, se necesitan pocos espermatozoides por ovocito y no existen problemas derivados del transporte de embriones. Aunque, por otra parte, sería interesante la utilización de la recongelación espermática tras el sexado si no hay algún laboratorio cercano para la FIV.

Además de los mencionados anteriormente, según López-Gatius *et al.* (2002), el progenitor podría ser uno de los motivos que podría llevar a la

pérdida de la gestación. Starbuck *et al.* (2004) encontraron incluso variaciones entre los progenitores en la habilidad para mantener la preñez. Del mismo modo, Markusfeld-Nir (1997) encontró que algunos toros estaban relacionados con los riesgos de pérdida gestacional. Por tanto, el proceso de doble recongelación espermática podría aumentar el riesgo de pérdida embrionaria tras IA con el semen de ciertos sementales (Underwood *et al.* 2009b).

Por otra parte, teniendo en cuenta que la congelación espermática reduce la capacidad de fecundación debido a la motilidad reducida y los cambios en la capacitación (Watson, 1995; Gillan *et al.*, 1997), es de suponer que la doble congelación espermática (y el sexado) podrían comprometer la capacidad de fecundación, y en el caso de que ésta sea exitosa, podría llevar a un bajo mantenimiento embrionario (Underwood *et al.* 2009b).

Parecen existir diferentes respuestas ante los tratamientos que sufre el semen entre distintas especies; ya que cuando se utilizó semen congelado, sexado y recongelado de carnero con FIV (Hollinshead *et al.*, 2004a) e IA (De Graaf *et al.*, 2007) se obtuvo fecundación, obtención de blastocistos y descendencia, del mismo modo al conseguido por las muestras de semen control en las que no se realizó sexado; demostrándose así, que la población de espermatozoides que sobreviven al sexado y a la recongelación espermática son capaces de fecundar y los embriones resultantes de mantener la gestación. Todo esto se explica por las diferencias en la funcionalidad espermática del semen congelado, sexado y recongelado de carnero con respecto al de toro, que inicialmente puede residir en una diferencia entre especies, aunque todavía se desconoce la razón específica de las mismas (De Graaf *et al.*, 2009).

6. CONCLUSIONES

1. Los sementales bovinos donantes de la raza Murciano Levantina presentan una alta variabilidad en cuanto a los parámetros seminales cuantitativos y de preparación posterior de dosis fecundantes destinadas al Banco de Germoplasma.
2. En la raza Murciano Levantina es posible realizar la recongelación espermática, manteniendo valores de parámetros seminales adecuados. La inseminación con semen recongelado permite alcanzar gestaciones.
3. Cuanto más agresivo es el tratamiento realizado previo a la congelación y recongelación, menor es la calidad espermática.
4. Con las técnicas empleadas no se detectan daños significativos en la cromatina espermática cuando se congela y/o recongela la célula espermática.
5. Las anomalías morfológicas del espermatozoide no aumentan ni disminuyen con la congelación o recongelación seminal. Siendo los tratamientos y manejos seminales intermedios los que alteran el valor de algún tipo de morfoanomalía.
6. El metabolismo energético medido por test de resistencia, se ve alterado con la manipulación de la célula espermática bovina, esta alteración aumenta con el tipo de tratamiento.
7. La recongelación seminal puede utilizarse para la predicción *in vitro* de la calidad del semen congelado.

7. RESUMEN

La raza bovina Murciano Levantina (ML) se utilizaba para labores agrícolas por su aptitud de trabajo. Hoy se encuentra en peligro de extinción por pérdida de utilidad ante la aparición de maquinaria agrícola. Los escasos criadores que la mantienen, no se dedican a la producción de ganado bovino, siendo los aspectos del folclore regional los que la hacen acorde con su aptitud de tracción.

El Banco de Germoplasma de la raza se inició en el año 2000 y en la actualidad hay 7280 dosis seminales congeladas y almacenadas en N₂L, pertenecientes a 13 toros ML, todos ellos muy emparentados. Con estas dosis se atiende tanto a la conservación *in vivo*, por cesión a los ganaderos y obtención de nuevos reproductores, como a la conservación *ex situ in vitro* para la futura reconstrucción de la raza en caso necesario; aunque el número de toros es insuficiente, puesto que se requiere semen de 25 toros conservados *in vitro*. El almacenamiento de dosis seminales es costoso por el aumento continuo de los precios del N₂L y actualmente existen métodos para disminuir las necesidades de gametos masculinos; el sexado espermático disminuiría a la mitad estos gastos, aunque posteriormente sería necesaria la recongelación de los gametos.

Los objetivos del presente trabajo son conseguir eficacia y eficiencia en el semen recongelado, disminuyendo el número de dosis seminales almacenadas, que serían descongeladas del Banco de Germoplasma, y a las que se les aplicaría un tratamiento similar al requerido por la tecnología de sexado espermático; siendo un objetivo derivado el estudio con técnicas convencionales del semen recongelado y relacionar los parámetros de calidad seminal del semen recongelado con aquellos toros que alcancen mejores valores de fertilidad con semen solamente congelado. Otro objetivo es poner a punto una técnica de recongelación que permita almacenar dosis seminales de forma más eficiente.

En este trabajo se han utilizado los datos procesados de dosis seminales de 12 toros de esta raza y los espermatozoides congelados pertenecientes a 6 de esos toros. Los métodos de estudio del eyaculado y de las dosis seminales son los convencionales para la especie bovina. Las técnicas de congelación y recongelación utilizadas son las mismas que para el Banco de Germoplasma. En las experiencias de aplicación de frío, el semen descongelado fue sometido a una recongelación después de haber sufrido un tratamiento (CT), o bien recongelado sin tratamiento (ST). Para conocer el valor de los parámetros estudiados han sido utilizadas técnicas de microscopía óptica y fluorescencia, resistencia en baño de agua termostático, tinciones de E-N, IP, lectinas, azul de toluidina e IA con semen descongelado a siete novillas de la raza Frisona.

En el ganado Murciano Levantino existe variabilidad en los valores promedio de calidad seminal entre los sementales, aunque esto no es debido a la edad. Además, no existen diferencias reseñables en los valores promedio de los parámetros de semen procedente del primer y segundo eyaculado de cada toro.

El análisis de los resultados permite conocer el daño en los espermatozoides durante la recongelación, siendo la calidad seminal en el semen descongelado superior a la del descongelado; con gran variabilidad entre toros. Un semental presentó mejores valores para los parámetros tras la congelación y descongelación, aunque en algún parámetro no hubo diferencias en ningún toro. Las anomalías espermáticas frecuentemente encontradas fueron las “colas en látigo”, pero ligeramente inferiores en el semen recongelado CT.

La inseminación de 7 novillas Frisonas proporcionó un porcentaje de fertilidad del semen recongelado ST del 57'1%, lo que concluye que la recongelación espermática se puede utilizar como técnica de predicción de la fertilidad y ser utilizada para la conservación *in vitro*.

8. SUMMARY

The *Murciano Levantina* (ML) bovine breed used to be employed for farming purposes because of their work aptitude. Nowadays, it is an endangered breed because it is no longer used for the mentioned purposes due to the arrival of technology and farming equipment. In addition, there are few ML bovine breeders and this is not their main occupation. This breed is mainly used during popular celebrations and festivals for transport.

The Germplasm Bank breed has been carried out since 2000 and currently, there are 7280 seminal doses of 13 ML bulls with high consanguinity among them. With these doses it is possible to carry out both *in vivo* conservation, cession to the breeders and new breeding males; and *ex situ in vitro* conservation for the future reconstruction of the race -if necessary. Although the number of seminal doses may seem enough for the recovery of the breed in the future, the number of bulls is not sufficient, because the *in vitro* cryopreservation of spermatozoa belonging to, at least, 25 bulls is necessary. The storage of seminal doses implies more maintenance costs because of the continued increase in prices; currently there are some methods to reduce the male gametes necessities; the sexing sperm could reduce in the middle these expenses, although, afterwards could be necessary the gametes refreezing.

The objectives of the present work are to obtain effectiveness and efficiency in refrozen semen, diminishing the number of frozen seminal doses stored at the Germplasm Bank, which would receive a treatment similar to that required by sexing technologies; being a derivative objective to study the usage of conventional technologies of refrozen semen, connecting the refrozen seminal quality parameters with the best fertility parameters in frozen semen. Another goal is the development of a refreezing technique that allows the storage of seminal doses more efficiently.

In this work we have used the processed data of seminal doses belonging to 12 bulls of that breed and the frozen spermatozoa of 6 of those bulls. The methods to study the ejaculates and seminal doses are the conventional ones employed in bovine species. The freezing and refreezing techniques used are

the same than those used for the Germplasm Bank. In the experiences with the application of cold, the thawed semen was refrozen after undergoing a certain treatment (CT), or it was refrozen without any treatment (ST). In order to know the value of the studied parameters the following methods have been used: the optical and fluorescent microscopy techniques, resistance in thermostatic water bath study, eosine-nigrosine, PI, lectins (PNA) and toluidine blue stainings and artificial insemination using refrozen semen in 7 Frisone breed heifers.

In the ML livestock there is variability in the seminal quality average values among the studs, although this is not due to the bulls' age. Additionally, there are not important differences regarding the average values between the first and the second ejaculation in each bull.

Statistical results permit to know the damage in spermatozoa during recryopreservation, and it was observed that the seminal quality is higher in frozen semen than in refrozen semen, with a high variability among bulls. Among the bulls, one of them presented the best results in each parameter studied after cryopreservation and recryopreservation, although there were no differences among the bulls regarding some parameters. The most frequent sperm abnormalities were the "tails in whip", but they were slightly lower in CT refrozen semen.

The artificial insemination of 7 Frisone heifers showed a percentage of fertility with ST refrozen semen of 57'1%. These results conclude that the refrozen semen can be used as a predictive technique of fertility, and thus, it can be used for the *in vitro* conservation of the studied bovine breed.

9. ABREVIATURAS

COREMUR: Asociación para la Conservación y Recuperación de la vaca Murciano Levantina.

CT: con tratamiento previo.

CIA: centro de inseminación artificial.

CP: crioprotector.

CIDR: *controlled internal drug releasing* (dispositivo intravaginal para la regulación del ciclo estral en vacas).

DMSO: dimetil sulfóxido.

E-N: eosina-nigrosina.

Esp: espermatozoide.

Fig: figura.

FIV: fecundación *in vitro*.

GANACULTURA: Asociación para la Conservación de las Tradiciones Ganaderas de Murcia.

IA: inseminación artificial.

INIA: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.

ICSI: inyección intracitoplasmática.

IMIDA: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.

IP: yoduro de propidio.

MIV: maduración *in vitro*.

ML: Murciano Levantino.

nº: número.

N₂L: nitrógeno líquido.

OPU: *ovum pick up*.

PNA: *peanut agglutinin*.

PIV: producción *in vitro*.

REGA: registro de explotaciones ganaderas.

ST: sin tratamiento previo.

VA: vagina artificial.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60: 169-279. 2003.
- Álamo-Santana D. Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs. ultracongelador de -152°C. *Tesis Doctoral. ULPG. Las Palmas. (España)*. 2007.
- Al-Makhzoomi A, Lundeheim N, Håård M, Rodríguez-Martínez, H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology*. 70: 682-691. 2008.
- Almela L, Peinado B, Duchi N, Poto A. Tipificación de huevos de pava Negra del Mediterráneo. *Proc VIII Congr SEAE. Bullas (Murcia)*. 2008a.
- Almela L, Peinado B, Duchi N, Poto A. Caracterización de palomas deportivas de Murcia. *Proc VIII Congr SEAE. Bullas (Murcia)*. 2008b.
- Almela L, Poto A, Galián S, Ruiz S, Romero J, Peinado B. Murcia se esfuerza por la supervivencia de su raza bovina autóctona. *Albéitar*. 143:18-20. 2011.
- Álvarez-Rodríguez, M. Mejora y evolución de los protocolos de congelación de eyaculados de oso pardo (*Ursus Arctos*). *Tesis Doctoral. Universidad de León (España)*. 2012.
- Amann RP, Pickett BW. Principles of Cryopreservation and a Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *J Equine Vet Sci*. 7: 145-176. 1987.
- Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl*. 2: 89-98. 1989.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Luc J, Courtens MA. Bull Semen in Vitro Fertility After Cryopreservation Using Egg Yolk LDL: A Comparison With Optidyl, A Commercial Egg Yolk Extender. *Theriogenology*. 61: 895-907. 2004.
- Andrade A. Influencia en la Calidad Espermática de la Adición de Distintas Concentraciones de Crioprotectores para la Conservación del Semen Canino. *Tesis Doctoral. UCM. Madrid (España)*. 2005.
- Angelino JN. Manual de evaluación de semen bovino. *Tesis Doctoral. Universidad de Veracruz (México)*. 2009.
- Anzar MHE, Buhr L, Kroetsch MM, Pauls KP. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*. 66: 354-360. 2002.

- Arav A, Zeron Y, Shturman H, Gacitua H. Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. *Reprod Nutr Dev.* 42: 583-586. 2002.
- Astiz, S, Romero-Aguirregomezcorta J, Poto A, Ruiz S. Producción de embriones *in Vitro* en el bovino: descripción de la técnica y ejemplos de su aplicación en España. *Frisona Esp.* 188: 88-92. 2012.
- Bajo JM, Coroleu B. Fundamentos de reproducción. *Médica Panamericana. Madrid (España).* 70. 2009.
- Bandularatne E, Bongso A. Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. *J. Androl.* 23: 242-249. 2002.
- Ballachey BE, Hohenboken WD, Evenson DP. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to fertility of bulls. *Biol Reprod.* 36: 915-925. 1987.
- 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.* 9: 109-115. 1988.
- Barajas DP, Coy P, Romar R, Peinado B, Galián M, Poto A. Efectos de la consanguinidad en la población bovina Murciano-Levantina. *Proc IV Congr Ibérico Rec Gen Anim y II Reunión Soc Port Rec Gen Anim. Ponte de Lima (Portugal).* 2004.
- Barrios, D.A. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros Post-Mortem. *Proc IX Congr Venezolano Prod Ind Anim. Valera (Venezuela).* 2002.
- Barth AD, Bowma PA, BO GA, Mapletoft RJ. Effect on narrow sperm head shape on fertility in cattle. *Can Vet J.* 53: 31-39. 1992.
- Bearden HJ, Fuquay. Reproducción Animal Aplicada. *El Manual Moderno. México (México).* 135-181. 1982.
- Beletti ME, Melo MLS. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology.* 62: 398-402. 2004.
- Beletti ME, Costa LF, Guardeiro MM. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz J Morphol Sci.* 22: 85-90. 2005.

- Berger T, Parker K. Modification of the zona free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *Gamete Res.* 22: 385-397. 1989.
- Berger T. Pisum sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology.* 33: 689-695. 1990.
- Bodó I. Special problems of conservation of Domestic livestock. *Proc 4th World Congr Gen App Liv Prod. Edinburgh (UK).* 427-433. 1990.
- Bonadonna T. Fisiopatología de la reproducción y fecundación artificial ganadera. *Salvat. Barcelona (España).* 769. 1962.
- Boyers SP, Davis R, Katz DF. Automated Semen Analysis. *Curr Prob Obst Gyn F.* 12: 172-200. 1989.
- Bradley LT. Cryopreservation of Bovine Spermatozoa. *Master Science. Thesis. University of Guelph (Canadá).* 1999.
- Bras K. Inseminación artificial en la especie equina. En: Biotecnología de la Reproducción. Palma G. (ed). *ReproBiotec. Mar del Plata (Argentina).* 549. 2001.
- Carballo DM. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. *Tesis Doctoral. Universidad de Veracruz (México).* 2005.
- Cardozo CJ. Evaluación reproductiva y de fertilidad de toros, y su utilización para aumentar la eficiencia reproductiva en sistemas del trópico bajo, Regional 1 C.I. *Tibaitatá.* 257. 2000.
- Carretero MI, Giuliano SM, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *In Vet.* 11. 2009.
- Carwell DB, Scott BR, Gentry GT, Bondioli KR, Godke RA. Refreezing post-thawed goat semen. *Reprod Fert Develop.* 23: 140-141. 2010.
- Catena M, Cabodevila J. Evaluación de semen bovino congelado. *Taurus.* 1: 18-31. 1999.
- Catena M, Cabodevila J. Evaluación de semen bovino congelado. En: <http://www.ganaderia.com.mx/articulos/ia/ia002.php>. 2002.
- Celeghini ECC, De Arruda RP, De Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci.* 104: 119-31. 2008.

- Chan SY, Fox EJ, Chan MM, Tsoi W, Wang C, Tang LC, Tang GW, Ho P. The relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test, routine semen analysis, and the human sperm zona-free hamster ovum penetration assay. *Fertil Steril*. 44: 668-672. 1985.
- Chauhan MS, Kapilar-Gandhi KK, Anand SR. Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoia during dilution. Cooling and freezing. *Andrología*. 26: 21-26. 1994.
- Choi YH, Love CC, Varner DD, Hinrichs K. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*. 65: 808-819. 2006.
- Christensen P, Brockhoff PB, Lehn-Jensen H. The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. *Reprod Dom Anim*. 34: 503-507. 1999.
- Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC. A Comparison Between Freezing Methods for the Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 108: 298-308. 2008.
- Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW. Effects of Centrifugation, Glycerol Level, Cooling to 5 Degrees C, Freezing Rate and Thawing Rate on the Post Thaw Motility of Equine Sperm. *Theriogenology*. 22: 25-38. 1984.
- Cole H, Cupps PT. Reproducción de los animales domésticos. *Acribia. Zaragoza (España)*. 222-223. 1984.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio C. Effect of Semen Preparation on Casa Motility Results in Cryopreserved Bull Spermatozoa. *Theriogenology*. 74: 424-435. 2010.
- Correa JR, Rodríguez MC, Patterson DJ, Zavos PM. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology*. 46: 413-420. 1996.
- Crespo García MJ. Conservación "Ex Situ" mediante la utilización de técnicas de reproducción animal asistida, y tipificación genética de las razas bovinas Tudanca y Monchina en Cantabria. www.cifacantabria.com. 2003.
- Danchi-Burge C, Bibé B, Planchenault D. La cryobanque nationale: mise en place d'une cryo-collection patrimoniale des races d'animaux d'élevage. *Proc 4ème Coll BRG, La Châtre (France)*. 111-113. 2001.
- *Decreto nº 129/2010*, de 4 de junio, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueban las reglamentaciones específicas de los libros genealógicos de

las siguientes razas autóctonas españolas en peligro de extinción: raza porcina Chato Murciano, raza bovina Murciano-Levantina y raza aviar Gallina Murciana.

- De Graaf SP, Evans G, Maxwell WCM, Cran DG, O'Brien JK. Birth of offspring of predetermined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*. 67: 391-398. 2007.
- De Graaf SP, Beilby KH, Underwood SL, Evans G, Maxwell WMC. Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule. *Theriogenology*. 71: 89-97. 2009.
- Dejarnette M. Select Sires. In: The Word's Source for Bovine Genetics. http://www.selectsires.com/newsreleases/noticias_2005_1215_1.aspx. 2010.
- Den Daas N. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci*. 28: 87-94. 1992.
- Derivaux J. Reproducción de los animales domésticos. 2ª ed. *Acribia Zaragoza (España)*. 167-193. 1982.
- Devrius LO, Ericsson H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res*. 42: 136-156. 1966.
- Didion BA, Dobrinsky JR, Giles, JR, Graves CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res*. 22: 51-57. 1989.
- *Directiva 88/407/CEE* del Consejo de 14 de Junio de 1988. En: R.D. 841/2011, de 17 de junio, por el que se establecen las condiciones básicas de recogida, almacenamiento, distribución y comercialización de material genético de las especies bovina, ovina, caprina, porcina y de los équidos. *BOE 168*. 2011.
- Dott HM, Foster GC. The Estimation of Sperm Motility in Semen, on a Membrane Slide, by Measuring the Area Change Frequency With an Image Analyzing Computer. *J Reprod Fertil*. 55: 161-166. 1979.
- Duarte A. Manual de inseminación Artificial de Ganado. *Universidad Autónoma de Tamaulipas (México)*. 3-53. 2006.
- Duchi N, Almela L, Peinado B, Poto A. Extracción y valoración de la calidad de semen del palomo Deportivo Murciano (*Columba livia*). *Arch Zootec*. 58: 537-540. 2009.
- Ericsson SA, Garner DL, Redelman D, Ahmed K. Assessment of the viability and fertilizing potencial of cryopreserved bovine spermatozoa

using dual fluorescent staining and two flow cytometric systems. *Gamete Res.* 22: 355-368. 1989.

- Ericsson SA, Garner DL, Johnson LA, Redelman D, Ahmed K. Flow cytometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa processed using new antibiotic combinations. *Theriogenology.* 33: 1211-1220. 1990.
- Eriksson B. Cryopreservation of boar semen. Studies on sperm viability in vitro and fertility. *Doctoral Thesis. University of Uppsala (Suecia).* 2000.
- Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. *Butterworths. Sydney (Australia).* 185. 1987.
- Evans G, Maxwell WMC. Inseminación Artificial de Ovejas y Cabras. *Acribia Zaragoza (España).* 1990.
- Evenson DP, Darznkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 240:1131-1134. 1980.
- Evenson DP, Darzynkiewicz A, Melamed MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem.* 30: 279-280. 1982.
- Evenson DP, Larson K, Jost L. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 23: 25-43. 2002.
- Fahy GM. The Relevance of Cryoprotectant 'Toxicity' to Cryobiology. *Cryobiology.* 23: 1-13. 1986.
- FAO. Primary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans. Domestic Animal Diversity Information System (<http://dad.fao.org/dadis/reference/library/library.htm>). FAO, Rome (Italy). Farnham Royal, Bucks. (UK). 1-181. 1998.
- FAO Newsroom. <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000464/index.html>. 2006.
- Foote RH. Factors Influencing the Quality and Quantity of Semen Harvested from Bull, Ram, Boars, and Stallions. *J Anim Sci.* 47: 1-11. 1978.
- Foote RH, Parks JE. Factors affecting preservation and fertility of bull Sperm: a brief review. *Reprod Fertil Dev.* 5: 665-673. 1993.
- Foote RH. The history of Artificial Insemination: Selected Notes and Notables. ASAS. 2002.

- Foote RH, Kaproth MT. Large batch freezing of bull semen: Effect of time of freezing and fructose on fertility. *J Dairy Sci.* 85: 453-456. 2002.
- Franco P, Borges MC. Spermatic feasibility after 20 years of freezing and refreezing- case study. *Braz Arch Biol Technol.* 53: 851-854. 2010.
- Frijters ACJ, Luismtra-Mulder TA. Time of freezing and the use of semen extenders based on soybean extracts and egg yolk in cryopreservation of bull semen: effects in vitro and on fertility in vivo. *AI Vets 2003. Budapest (Hungary).* 6-13. 2003.
- Frijters ACJ, Mullaart E, Roelofs RMG, Van Hoorne RP, Moreno JF, Moreno O, Merton JS. What affects fertility more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology.* 71: 64-67. 2009.
- Gadea J. Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vitro". *Tesis Doctoral. Universidad de Murcia (España).* 1997.
- Gadea J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine Spanish. *J Agr Sci.* 1: 17-27. 2003.
- Galián M, Peinado B, Poto A. Caracterización productiva de la gallina de raza Murciana como paso previo a la obtención de un producto cárnico genuino. *Alimentaria.* 371: 115-116. 2006.
- Galián S, Almela L, Peinado B, Azevedo J, Ruiz S, Romero J, Poto A. Actuaciones en el banco de germoplasma de la raza bovina Murciano-Levantina. *FEAGAS.* 36: 131- 135. 2010.
- Galli A, Bosisio M. Quality of semen stored at +15/16°C is related to fertility of artificially inseminated swine. *Theriogenology.* 30: 1185-1190. 1988.
- Gandini GC, Pizzi F, Stella A, Boettcher PJ. The costs of breed reconstruction from cryopreserved material in mammalian livestock species *Genet Sel Evol.* 39: 465-479. 2007.
- García, JA. Valoración de la aptitud reproductiva de toros de monta natural. *Tec Agroalimen Inf Gan.* 11: 33-38. 2013.
- Garde, J. Congelación de semen en la especie ovina. Características biológicas de las dosis descongeladas. *Tesis Doctoral. UCM. Madrid (España).* 1992.
- Gardón JC, Matás C, Gadea J. Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica. *An Vet (Murcia).* 17:19-26. 2001.

- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod.* 34: 127-138. 1986.
- Garner DL, Johnson LA, Allen CH. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. *Theriogenology.* 30: 369-378. 1988.
- Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod.* 53: 276-284. 1995.
- Garner DL. Ancillary test of bull semen quality. Bull Infertility. *Vet Clin N AM-Food A.* 13: 313-330. 1997.
- Gauthier D. Variations saisonnières de la production spermatique et du comportement sexuel des taures créoles en Guadeloupe. Reproduction des ruminants en zone tropicale. *Reunion Int. Point-a Pitre, Guadeloupe (France).* 501- 508. 1984.
- Gil J, Januskaukas A, Haard MCH, Haard MGM, Johanisson A, Soderquist L, Rodriguez-Martínez H. Functional Sperm Parameters and Fertility of Bull Semen Extended in Biociphos-Plus R and Triladyl R. *Reprod Dom Anim.* 35: 69-77. 2000.
- Gillian L, Evans G, Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fert Develop.* 9: 481-487. 1997.
- Gilbert GR, Almquist JO. Effects of processing procedures on post thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 0.3 ml straws at room temperature. *J Anim Sci.* 46: 225- 231. 1978.
- Gloria Agüero EG. Evaluación de las seminales de sementales bovinos mediante el analizador seminal computerizado (CASA). *Postgrado en Reproducción Animal y Tecnología de la Inseminación Artificial Universidad Central de Venezuela (Venezuela).* 2012.
- Gómez MV, Migliorisi AL. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *UNLP. Buenos Aires (Argentina).* 2007.
- Graham EF, Schmehl MKL, Nelson DS. Problems with laboratory assays. *Proc. 8th Tech. Conf. AI Reprod. NAAB. Milwaukee (USA).* 1-8. 1980.
- Guimaraes T, Ribeiro V, Paes R, Furugen A, Luz L, Gilli F, Matias JA, De Andrade VJ. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci.* 120: 31-38. 2010.

- Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. *McGraw Hill Interamericana. México (México)*. 2000.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J Androl.* 11: 73-88. 1990.
- Hashizume T, Tanimura J, Kanematsu S. Morphological changes of the acrosome in boar spermatozoa during and after cell death. *Jpn J Anim Reprod.* 36: 35-39. 1990.
- Haugan T, Reksen O, Gröhn YT, Gaustad AH, Hofmo PO. A retrospective study on effects of storage time of liquid boar semen on reproductive performance in Norwegian swine. *Theriogenology.* 64: 891-901. 2005.
- Herrick JB, Self HL. Evaluación de la Fertilidad del Toro y el Verraco. *Acribia. Zaragoza (España)*. 1965.
- Hidalgo M. Estudio del Efecto de la Congelación-Descongelación sobre los Parámetros Morfométricos del Espermatozoide del Macho Cabrio. *Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba (España)*. 2004.
- Hidalgo-Ordóñez CO, Tamargo M, C, Díez C. Análisis del Semen Bovino. Tecnología Agroalimentaria. *Boletín Informativo SERIDA.* 2: 39-43. 2005.
- Hiemstra SJ, Van Der Lende T, Woelders H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. In: *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources. FAO. Rome (Italy)*. 25-35. 2005.
- Hollinshead FK, Evans G, Evans KM, Catt SL, Maxwell WMC, O'Brien JK. Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction.* 127: 557-568. 2004a.
- Hollinshead FK, O'Brien JK, Maxwell WMC, Evans KM. Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology.* 62: 958-968. 2004b.
- Holt WV, Pickard, AR. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod.* 4:143-150. 1999.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* 62: 3-22. 2000.
- Holt WV, Van Look JW. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality. *Reproduction.* 127: 527-535. 2004.

- Howard TH, Pace MM. Seminal evaluation and artificial insemination: Fertility and Infertility in Veterinary Practice. Laing JA, Morgan WJ, Wagner WC (eds). *Bailliere Tindall. London (UK)*. 39-51. 1998.
- Humblot P. La mortalité embryonnaire chez les bovins. In: Colloque de La Société française pour l'Etude de la Fertilité. *Recherches récentes sur l'épidémiologie de la fertilité*. 213-246. 1986.
- Hunter RHF. Reproducción de los animales de Granja. *Acribia. Zaragoza (España)*. 2. 1987.
- Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Long-Term Preservation of Chilled Canine Semen: Effect of Commercial and Laboratory Prepared Extenders. *Theriogenology*. 55: 671-684. 2001.
- Januskaukas A, Soderquist L, Haard MG, Haard MCH, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility on Swedish Red and White AI bulls. *Acta Vet Scand*. 37: 461-470. 1996.
- Januskaukas A, Zilinskas H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bulls fertility. *Vet Med Zoot*. 17. 2002.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Pérez-Pelaez M, Crabo O, Taneveld LJD. Development of an Assay to Assess the Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and its Relationship to other Semen Characteristics *J Reprod Fert*. 70: 219-228. 1984.
- Jeyendran RS, Van der ven HH, Rosecrnas R, Pérez-Pelaez M, Al-hasani S, Zaneveld LJD. Chemical constituents of human seminal plasma: Relationship to fertility. *Rev Int Andrologia*. 21: 423-428. 1989.
- Jiménez MFS, Puchades, E, Moce MP, Viudes de Castro MP, Vicente JS, Rodríguez, M. Use of Powdered Egg Yolk vs Fresh Egg Yolk for the Cryopreservation of Ovine Semen. *Reprod Dom Anim* 39: 438-441. 2004.
- Kelly L, Denis S, Barone K, Zieschang JA, Melton A. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*. 93. 2010.
- Koivisto MB, Costa MTA, Perri SHV, Vicente WRR. The Effect of Season on Semen Characteristics and Freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* Bulls in the Southeastern Region of Brazil. *Reprod Dom Anim*. 44: 587-592. 2009.
- Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl*. 13: 342-348. 1992.

- Kovacs A, Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem.* 67: 119-124. 1992.
- Kupferschmied H. Recherches sur le passage des paillettes moyennes aux paillettes fines dans l'insémination artificielle bovine. *Zuchthyg.* 7: 67-71. 1982.
- Lake PE, Stewart JM. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen. An improved method. *Br Poult Sci.* 19: 187-194. 1978.
- Lake PE. Evaluation of boar semen. In: Current therapy in Theriogenology. *Morrow DA (ed.). Saunders. Philadelphia (USA).* 972-5. 1986.
- Lawson RL, Krise GM, Sorensen AM. Electroejaculation and evaluation of semen from the albino rat. *J Appl Physiol.* 22: 174-176. 1967.
- Leffler KS, Walters CA. A comparison of time, temperature, and refreezing variables on frozen sperm motility recovery. *Fertil Steril.* 65: 272-4. 1996.
- Linford EFA, Glover C, Bishop C, Stewart DL. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J Reprod Fertil.* 47: 283. 1976.
- Long JA. Avian semen cryoconservation: what are the biological challenges?. *Poult Sci Assoc.* 85: 232-36. 2006.
- Lömker R, Simon DL. Costs of and inbreeding in conservation strategies for endangered breeds of cattle. *Proc. 5th World Congr Appl Livest Prod. Nebraska (USA).* 21: 393-396. 1994.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz J, Rutllant J, López-Béjar M. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology.* 57: 1251–1261. 2002.
- Mann T, Lutwak-Mann C. Male reproductive function and semen. *Springer-Verlag. Berlin (Germany).* 1981.
- Manual de uso y preparación del diluyente Triladyl. *Laboratorio Minitübe.* 1993.
- Manual de uso y preparación del diluyente Universal de IMV. *Laboratorio Universal IMV.* 1995.
- Marín MI. Endocrinología Veterinaria y Fisiología de la Reproducción. *Calibac. Madrid (España).* 598. 1994.
- Markusfeld-Nir O. Epidemiology of bovine abortions in Israeli dairy herds. *Prev Vet Med.* 31: 245–255. 1997.

- Martín G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod.* 71: 28-37. 2004.
- Matás C, Sansegundo M, Ruiz S, García FA, Gadea J, Romar R, Coy P. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology.* 74: 1327-1340. 2010.
- Maxwell WMC, Landers AJ, Evans G. Survival and Fertility of Ram Spermatozoa Frozen in Pellets, Straws and Mintubes. *Theriogenology.* 43: 1201-1210. 1995.
- Maxwell WMC, de Graaf SP, Ghaoui Rel-H, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 64: 13-38. 2007a.
- Maxwell WMC, Parrilla I, Cabalero I, García E, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM, Rath D. Retained Functional Integrity of bull spermatozoa alter double freezing and thawing using puresperm[®] density gradient centrifugation. *Reprod Dom Anim.* 42: 489-494. 2007b.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 247: 125-142. 1984a.
- Mazur P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mamalian ova and embryos. *Anim Reprod Sci.* 28: 239-245. 1984b.
- McCue PM, Kelly JM, Moore AI, Bruemmer JE, Walker SK. Refrozen semen: sperm characteristics in horses and in vitro embryo production in ruminants. *Proc. 6th Int Symposium on Equine Embryo Transfer. Río de Janeiro (Brazil).* 2004a.
- McCue PM, Moore AI, Bruemmer JE. Refreezing stallion spermatozoa for assisted reproduction. *Reprod Fert Develop.* 16: 176-177. 2004b.
- McCue PM, Kelly J, Ashworth S, Kleemann D, Walker S. Effect of refreezing bull semen on IVF success rate. *Reprod Fert Develop.* 17: 275-275. 2005.
- Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodríguez JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology.* 57: 327-344. 2002.
- Medina-Robles VM, Sánchez-Carvajal E, Velasco-Santamaría YM, Cruz-Casallas PE. Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio de un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Rev Orinoquia.* 11: 75-86. 2007.

- Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. Comparison of semen collection techniques in goats. *Theriogenology*. 26: 823-827. 1986.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de la Producción Agraria. Subdirección General de la Producción Animal. *Manual de Normas Técnicas para la Congelación de Semen en la Especie Bovina*. 1985.
- Mocé E, Graham JK. In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci*. 105: 104-118. 2008.
- Morillo M, Salazar S, Castillo E. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas-INIA*: 1-59. 2012.
- Morton KM, Rowe AM, Maxwell WMC, Evans G. In vitro and in vivo survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*. 65:1333-1345. 2006.
- Muiño R, Fernández M, Areán H, Viana JL, López M, Fernández A, Peña AI. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de Inseminación Artificial. *ITEA*. 101:175-191. 2005.
- Muiño R, Fernández M, Viana JL, Fernández A, Peña AI. Influencia de la raza y la pubertad en parámetros cinéticos de eyaculados bovinos. *ITEA*. 102: 55-56. 2006a.
- Muiño R, Fernández M, Peña AI. Parámetros cinéticos en eyaculados bovinos de toros de raza Frisona y Rubia Gallega. *ITEA*. 102: 55-66. 2006b.
- Muiño R, Fernández M, Peña AI. Post-thaw Survival and Longevity of Bull Spermatozoa Frozen with an Egg Yolk-based or Two Egg Yolk-free Extenders after an Equilibration Period of 18 h. *Reprod Dom Anim*. 42: 305-311. 2007.
- Muiño R. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. *Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España)*. 2008.
- Muiño R, Pena, AI, Rodriguez A, Tamargo C, Hidalgo CO. Effects of Cryopreservation on the Motile Sperm Subpopulations in Semen from Asturiana de los Valles Bulls. *Theriogenology*. 72: 860-868. 2009.
- Nava-Trujillo H, Quintero-Moreno A, Hernández- Fernández A, Vilchez-Siu V, Osorio-Meléndez C, Rubio-Guillén J, González-Villalobos D, Finol-Parra G. Efecto de la Integridad de la cromatina sobre la morfometría de

- la cabeza del espermatozoide de toro. *Rev Cient FCV-LUZ*. 23: 67-72. 2013.
- Nicolás M, Álvarez M, Borragán S, Martínez-Pastor F, Chamorro CA, Álvarez-Rodríguez M, de Paz P, Anel L. Evaluation of the qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (MaxiFreeze®, Cushion Fluid Equine® and PureSperm® 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa. *Theriogenology*. 77:1119-1128. 2012.
 - Niwa T, Ito K, Loo I, Hashizume T. Studies on the deep freezing storage of boar semen by pelleting method. *Bull Lab Iwate Univ*. 1: 68-84. 1981.
 - Nothling JO, Arndt EP. Fertility of two bulls with poor sperm morphology. *J S Afr Vet Assoc*. 66: 74-76. 1995.
 - Oettlé EE. Sperm morphology and fertility in the dog. *Reprod Fertil*. 47: 257-260. 1993.
 - Oldenbroeck JK. Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources. *Inst Anim Sci Health*. 1-9. 1999.
 - Olivares R, Urdaneta R. Colección, evolución y procesamiento del semen de toros. *Fonaiap Divulge*. 17: 4-9. 1985.
 - Ollivier L, Renard JP. The costs of cryopreservation of animal genetics resources. *Proc. 46th Ann Meet EAAP. Praha (Czech Republic)*. 1995.
 - Orji BI, Igboeli G, Nwakalor LN. Semen Characteristics of Muturu Bulls-Bos brachyceros. *Theriogenology*. 22: 197-203. 1984.
 - Orozco F. Algunas ideas sobre el concepto de raza en animales domésticos. *Rev INIA*. 10. 1985.
 - Oses V, Callejas S, Cabodevila J. Inseminación artificial en bovinos: el lugar de descarg del semen y la dosis inseminante, factores en constante revisión. *Taurus*. 10: 26-37. 2008.
 - Owiny OD, Barry DM, Godke RA. Effects of repeated freeze-thawing of bovine epididymal sperm on in vitro embryo development. *Afr J Anim Biomed Sci*. 5: 56-64. 2010.
 - Pace MM. Fundamentals of assay of spermatozoa. *Proc 9th Int Congr Anim Reprod & AI. Madrid (España)*. 133-146. 1980.
 - Pace MM, Sullivan JJ, Elliot FI, Graham EF, Coulter GH. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5 ml French straws. *J Anim Sci*. 53: 693-701. 1981.

- Panés A. La ganadería Murciana. *Artes Gráficas Mateu. Murcia (España)*. 20-22. 1916.
- Parks JE, Graham JK. Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *Theriogenology*. 38: 209-222. 1992.
- Peinado B, Poto A, Marín M, Lobera JB. Raza porcina Chato Murciano. *Porci*. 61: 39-55. 2001.
- Peinado B, Poto A, Marín M. Situación actual de la raza bovina Murciano-Levantina. *Proc V Congr SERGA. Madrid (España)*. 2002a.
- Peinado B, Poto A, Marín M, De la Fuente J. Estudio zoométrico y estándar racial de la vaca Murciano-Levantina. *Proc V Congr SERGA. Madrid (España)*. 2002b.
- Peña A, Linde-Forsberg C. Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 54: 703-718. 2000.
- Pérez F, Pérez F. Dilución del esperma. Reproducción animal, Inseminación artificial y Transplante de embriones. *Científico-Médica. Barcelona (España)*. 6: 215-249. 1985.
- Phillips NJ, Evans G, McGowan MR. Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian livestock semen processing centres. *Aust Vet J*. 82: 309-310. 2004.
- Phillips PH. Preservation of Bull Semen. *J Biol Chem*. 130: 415. 1939.
- Pintado B, De la Fuente J, Roldán ERS. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258 or to eosin: accuracy in the assesment of cell viability. *J Reprod Fertil*. 118: 145-152. 2000.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*. 164: 666. 1949.
- Polge C, Salamon S, Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet Rec*. 87: 424-428. 1970.
- Porcu E. Oocyte criopreservation. In: Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives. *Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (eds). Martin Dunitz. London (UK)*. 2001.

- Poto A, Peinado B. Diferentes aplicaciones de las técnicas de conservación “ex situ” en las razas autóctonas. *Horticultura y Ganadería Tropical*. 8: 4-9. 1999.
- Poto A, Peinado B, Marín M, Lobera JB. El cerdo Chato Murciano. *Ediporc. Especial SEPOR. Murcia (España)*. 52: 3-13. 2002.
- Poto A, Tusa K, Alcaraz F, Galián M, Peinado B. Tipificación de los eyaculados bovinos en la raza Murciano-Levantina. *Proc II Congr Nac Carne de Vacuno. Gijón (España)*. 2006a.
- Poto A, Tusa K, Alcaraz F, Galián M, Peinado B. Criocongelación de semen de toro Murciano-Levantino usando un diluyente a base de fosfolípidos vegetales. Comparación con las técnicas tradicionales de la calidad del semen descongelado. *Proc. II Congr Nac Carne de Vacuno. Gijón (España)*. 2006b.
- Poto A, Aguirregomezcorta J, Peinado B, Ruiz S, Almela L. La conservación de la raza bovina Murciano-Levantina. *Coag-IR Murcia*. 41: 16-19. 2011.
- Poto A. Respuesta a las técnicas reproductivas de las razas en peligro de extinción. Influencia de la consanguinidad. *Proc VIII Congr Ibérico Rec Gen Anim. Évora (Portugal)*. 2012.
- Poto A, Almela L, Peinado B, Romero-Aguirregomezcorta J, Ruiz S. Aplicación de numerosas técnicas reproductivas para la obtención de un ternero Murciano-Levantino. *Proc VIII Congr Ibérico Rec Gen Anim. Évora (Portugal)*. 2012.
- Prieto ME, Espitia, PA, Cardozo, NJ. Effect of winter and summer on the reproductive behavior of the crossbred bulls. *Rev MVZ* .12: 921-928. 2007.
- Pribenszky Cs, Molnar M, Horvath A, Kútvölgyi G, Harnos A, Szenci O, Dengg J, Lederer J. Substantial increase of post-thaw survival of frozen bull semen by hydrostatic pressure assisted freezing. *Proc 18th AI Vets. Boras (Sweden)*. 2006.
- Pursel VG, Johnson LA. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*. 1: 638-641. 1974.
- Pursel VG, Johnson LA. Freezing of boar spermatozoa. Fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure. *J Anim Sci*. 40: 99-102. 1975.
- Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ. Relationship of competitive fertility to quality of boar semen. *Proc 10th Int Congr Anim Reprod Artif Insem. Urbana (USA)*. 2: 63-65. 1984.

- Quintero A, González D. Descongele adecuadamente su pajueta de semen. En: Manual de Ganadería Doble Propósito. *Astro-Data. Maracaibo (Venezuela)*. 515-518. 2005.
- Quintero-Moreno A, Rubio-Guillén J. Evaluación de la calidad espermática en toro mediante tecnología informática. En: Manual de Ganadería Doble Propósito. *Astro-Data. Maracaibo (Venezuela)*. 707-714. 2008.
- Quintero-Moreno AA, Rubio-Guillén JL, González, DM. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Rev Cient FCV-LUZ*. 19. 2009.
- Quintin FJ, Picot A, Hernández M, Sanz MA, Pastor F, Sevilla E, Alabart JL, Vijil E. Situación actual del banco de recursos genéticos de la raza bovina Serrana de Teruel. *XV Jorn Prod Anim-AIDA. Zaragoza (España)* I: 374-376. 2013.
- Rao M, Rao R. Studies on semen characteristics of Tharparkar and Jersey Bulls. *Ind Vet J*. 52: 889-900. 1975.
- Rath D, Johnson LA. Application and Commercialization of Flow Cytometrically Sex-Sorted Semen. *Reprod Dom Anim*. 43: 338-346. 2008.
- *Real Decreto 2129/2008*, de 26 de diciembre, por el que se establece el programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas.
- Reyes-Moreno C, Gagnon A, Sullivan R, Sirard M. Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J Androl*. 21: 876-886. 2000.
- Reyes-Moreno C, Boilard M, Sullivan R, Sirard M. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during *in vitro* storage. *Biol Reprod*. 66: 159-166. 2002.
- Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC, Varner DD. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. *Anim Reprod Sci*. 68: 171-180. 2001.
- Rodero E, Delgado JV, Rodero A, Camacho ME. Conservación de razas autóctonas andaluzas en peligro de extinción. *Serv Pub y Divulgación. Junta Andalucía. Sevilla (España)*. 15-62. 1994.
- Rodríguez OL, Brendtson WE, Ennen BD, Pickett BW. Effects of Rates of Freezing, Thawing and Level of Glycerol on the Survival of Bovine Spermatozoa in Straws. *J Anim Sci*. 41:129-136. 1975.

- Rodríguez-Martínez H. Nuevas técnicas de evaluación de la fertilidad en el macho. *Proc II Congr Ibérico Reprod Anim. Lugo (España)*. 302-316. 1999.
- Rodríguez-Martínez H. Evaluación del semen congelado: Métodos tradicionales y de actualidad, Topics in Bull Fertility. *Int Vet Inf Serv. New York (USA)*. 2000.
- Rosenberger G. Exploración clínica de los bovinos. *Hemisferio Sur. Buenos Aires (Argentina)*. 1981.
- Rosen WG. National Forum on BioDiversity Conference. Citado en: Izco J. Biodiversidad y conservación. Botánica. *McGraw-Hill Interamericana Madrid (España)*. 663-706. 1986.
- Rubio-Guillén J, Quintero-Moreno A. Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar la funcionalidad espermática en toros. En: Manual de Ganadería Doble Propósito. *Astro-Data. Maracaibo (Venezuela)*. 618-627. 2008.
- Ruiz SB, Herrera HJG, Ruiz HH, Lemus FC, Hernández GA, Gómez CH, Barcena JR, Rojas, MRI. Capacidad reproductiva de sementales activos en un sistema de monta abierta de los GGAVATT en el municipio de Villaflores, Chiapas. *Proc II Congr Intern Prod Anim. I Simp Intern Prod Rumiantes. La Habana (Cuba)*. 50: 1-6. 2007.
- Ruiz B, Ruiz H, Mendoza P, Oliva A, Gutiérrez FA, Rojas RI, Herrera JG, Ruiz DL, Aguilar G, León H, Bautista G, Ruiz A, Ibarra CE, Villalobos A. Caracterización reproductiva de toros Bos Taurus y Bos indicus y sus cruzas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico Mexicano. *Rev Cient UDO Agrícola*. 10: 94-102. 2010.
- Ruiz S, Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz S, Peinado B, Almela L, Poto A. Application of Reproductive Biotechnology for the Recovery of Endangered Breeds: Birth of the First Calf of Murciana-Levantina Bovine Breed Derived by OPU, In Vitro Production and Embryo Vitrification. *Reprod Dom Anim*. 48: e81-e84. 2013.
- Saacke RG, Marshall CE. Observation on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 16: 511-14. 1968.
- Saacke R. Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc 4th Tech Conf NAAB. Columbia (USA)*. 22. 1972.
- Saacke RG. What happens when sperm is frozen and thawed? *Proc 9th Tech Conf NAAB. Milwaukee (USA)*. 6-12. 1982.
- Salisbury GW, Vandemark DL. Physiology of Reproduction and artificial insemination of cattle. *Freeman. London (UK)*. 361. 1961.

- Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. *Freeman. London (UK)*. 313. 1978.
- Salisbury GW, Vandermark NL, Lodge JR. Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bovinos. *Acribia. Zaragoza (España)*. 419-517. 1982.
- Sánchez A. Razas Bovinas Españolas. *Extensión Agraria. MAPA. Madrid (España)*. 1984.
- Sánchez A. Razas Ganaderas Españolas Bovinas. *FEAGAS y MAPA. Madrid. Madrid (España)* 2002.
- Sánchez L, Fernández-Rodríguez M, Vallejo-Vicente M. Formación de un banco de germoplasma (semen y embriones congelados) en el programa de preservación de las razas bovinas morenas gallegas. *Arch Zootec*. 41: 485-496. 1992.
- Saragusty J, Gacitua H, Zeran Y, Rozenboim I, Arav A. Double freezing of bovine semen. *Anim Reprod Sci*. 115: 10-17. 2009.
- Schenk JL, Cran DG, Everett RW, Seidel Jr, GE. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*. 71: 717-728. 2009.
- Schilling E, Vengust M, Smidt D. A new test to predict the freezeability and storage of boar spermatozoa. In: *Proc 8th IPVS Congr. Ghent (Belgium)*. 296. 1984.
- Sellés E, Gadea J, Romar R, Matás C, Ruiz S. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Dom Anim*. 38: 66-72. 2003.
- Sydney JR, Sandro C. Feasibility of refreezing human spermatozoa through the technique of liquid nitrogen vapour. *Int Braz J Urol*. 30: 487-493. 2004.
- Söderquist L, Rodríguez-Martínez H, Haard MGH, Lundeheim N. Seasonal variation in sperm morphology in proven swedish dairy AI bull. *Reprod Dom Anim*. 32: 263-265. 1997.
- Sorensen MA. Reproducción Animal. *McGraw-Hill Interamericana. Madrid (España)*. 117-192. 1984.
- Sotillo JL, Serrano V. Producción Animal. Etnología Zootécnica. *Tebas-Flores. Madrid (España)*. 1985.

- Souza JMG, Batista RITP, Melo LM, Freitas VJF. Reproductive biotechnologies applied to the conservation of endangered ruminant - past, present and future. *Rev Port Ciênc Vet.* 106: 31-38. 2011.
- Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Reprod.* 5: 29-37. 1999.
- Stalhammar EM, Janson L, Philipsson J. The impact of sperm motility on non-return rate in preselected dairy bulls. *Reprod Nutr Dev.* 34: 37-45. 1994.
- Starbuck MJ, Dailey RA, Inskeep EK. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 84: 27-39. 2004.
- Statistical Analysis System Institute (SAS). *SAS/STAT User's Guide. V8. Cary (USA).* 2001.
- Taberlet P, Coissac E, Pansu J, Pompanon F. Conservation genetics of cattle, sheep and goats. *C R Biol.* 334: 247-254. 2011.
- Tamargo C, De La Fuente J, Rodríguez A, Pérez-Garnelo SS, Fernández A, Benito JM, Hidalgo CO. Creación en Asturias de un banco de germoplasma de razas autóctonas. *Arch Zootec.* 1: 529-532. 2009.
- Tamayo M, Duvergel O. Evaluación bioquímica y morfológica del semen almacenado crio conservado de 1 a 20 años en el Centro Provincial de Inseminación Artificial de La Habana. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAH y Centro para el Mejoramiento Animal de Ganadería Tropical (CIMAGT). La Habana (Cuba).* 1992.
- Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic Value of Spermatological Parameters as Predictors of in Vitro Fertility of Frozen-Thawed Bull Semen. *Theriogenology.* 62: 1245-1252. 2004.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange fluorescence. *Fert Steril.* 42: 87-91. 1984.
- Thilmant P. Congélation du Sperme de Verrat en Paillette de 0.5 ml. Résultats sur le Terrain. *Ann Méd Vét.* 141: 457-462. 1997.
- Thum R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg Yolk Extender for Cryopreservation of Bull. *Theriogenology.* 57: 1087-1094. 2002.
- Toyama Y, Itoh Y. Ultrastructural features and pathogenesis of knobbed spermatozoa in a boar. *Am J Vet Res.* 54: 743-749. 1993.

- Underwood SL, Bathgate R, Maxwell WMC, Evans G. Insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, refrozenthawed dairy bull sperm close to the time of ovulation. *Reprod Dom Anim.* 43: 67. 2008.
- Underwood SL, Bathgate R, Maxwell WMC, Evans G. In vitro characteristics of frozen-thawed, sex-sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 37°C. *Theriogenology.* 72: 1001-1008. 2009a.
- Underwood SL, Bathgate R, Maxwell WMC, Evans G. Development of procedures for sex-sorting frozen-thawed bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 44: 460-466. 2009b.
- Underwood SL, Bathgate R, Ebsworth M, Maxwell WMC, Evans G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed dairy bull sperm. *Anim Reprod Sci.* 118:7-12. 2010a.
- Underwood SL, Bathgate R, Maxwell WMC, Evans G. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Anim Reprod Sci.* 118: 171-175. 2010b.
- Underwood SL, Bathgate R, Pereira DC, Castro A, Thomson PC, Maxwell WMC, Evans G. Embryo production after in vitro fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology.* 73: 97-102. 2010c.
- Vallecillo A. Caracterización reproductiva de toros de la raza Marismeña como base a su conservación. *Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. (España).* 2011.
- Vázquez I, Cortés S, Borque C. Conservación del Semen de Macho Cabrio. Producción Ovina y Caprina. *XXIII Jorn Cient SEOC. Vitoria (España).* 2: 31-36. 1998.
- Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Coy P, Ruiz S. Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. *Theriogenology.* 38: 843-852. 1992.
- Vázquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vázquez JL, Martínez EA. Sexsorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology.* 71: 80-88. 2009.
- Vejarano OA, Sanabria LRD, Trujillo LGA. Diagnóstico de la capacidad reproductiva de toros en ganaderías de tres municipios del alto magdalena. *MVZ-Córdoba.* 648-662. 2005.
- Vera MO. Evaluación seminal comparativa pre y pos congelación en machos bovinos. Capítulo XII. En: Reproducción Bovina. González-Stagnaro C. (ed). *Astro-Data. Maracaibo (Venezuela).* 1-11. 2003.

- Vera MO, Muñoz G. Cómo mejorar la colección, manejo y calidad microbiológica del semen. En: Manual de Ganadería Doble Propósito. *Astro-Data. Maracaibo (Venezuela)*. 2005.
- Vera, CA. Evaluación de la validez de la cría y análisis de semen para predecir la fertilidad del toro. *Tesis Doctoral. Universidad de Cuenca (Ecuador)*. 2011.
- Verza SJr, Esteves SC. Feasibility of refreezing human spermatozoa through the technique of liquid nitrogen vapour. *Int Braz J Urol*. 30: 487-493. 2004.
- Verza SJr, Feijo CM, Esteves SC. Resistance of human spermatozoa to cryoinjury in repeated cycles of thaw-refreezing. *Int Braz J Urol*. 35: 581-591. 2009.
- Vilakazi DM, Webb EC. Effect of age and season on sperm morphology of Friesland Bulls at an artificial insemination centre in South Africa. *S Afr J Anim Sci*. 34: 62-69. 2004.
- Vishwanath R, Shannon P. Storage of Bovine Semen in Liquid and Frozen State. *Anim Reprod Sci*. 62: 23-53. 2000.
- Watson PF. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein factor of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *J Thermal Biol*. 1: 137-141. 1976.
- Watson PF. The Preservation of Semen in Mammals. In: Oxford Reviews of Reproductive Biology. *Oxford Univ Press. Oxford (UK)*. 283-350. 1979.
- Watson PF. The Effects of Cold Shock on Sperm Cell Membranes. In: Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. GJ Morris, Clark A (eds). *Academic Press. New York (USA)*. 1981.
- Watson PF. Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of Their Post-Thawing Function. *Reprod Fert Dev*. 7: 871-891. 1995.
- Watson PF. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Anim Reprod Sci*. 60-61: 481-492. 2000.
- Wendee BS. Effect of semen parameters of bovine spermatozoa after using a contemporary collecting receptacle. *Doctoral Thesis. Texas University. (USA)*. 2007.
- Woelders H. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. In: Boar semen preservation II. Johnson LA, Rath D (eds.) *Paul Parey. Berlin (Germany)*. 145-164. 1991.

- Woelders H, Zuidberg CA, Hiemstra SJ. Applications, limitations, possible improvements and future of cryopreservation for livestock species. In: *Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe*. Planchenault D (ed.) Paris (France). 67-76. 2003.
- Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2: 371-372. 1994.