

Influencia del donante de semen en la recongelación de espermatozoides bovinos de raza Murciano Levantina

Laura Almela-Veracruz^{1,*}, Begoña Peinado-Ramón¹, Salvador Ruiz-López² y Ángel Poto-Remacha¹

¹ Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA). C/ Mayor s/n. 30150 La Alberca, Murcia, España

² Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, Murcia, España

Resumen

El Banco de Germoplasma de la raza bovina Murciano Levantina (ML) consta de 7775 dosis seminales, donde ninguna de éstas ha sufrido tratamiento de sexado espermático. El objetivo de este trabajo es conocer la influencia del semental ML sobre el proceso de recongelación seminal. Para este estudio se emplearon como donantes de semen, seis toros ML, raza declarada amenazada, donde las dosis seminales obtenidas fueron congeladas y descongeladas por una metodología convencional; y seguidamente recongeladas y valoradas mediante estudios de fertilidad *in vitro* e *in vivo* (inseminación artificial-IA). Los resultados obtenidos nos permiten estudiar la fertilidad *in vitro* con unos resultados de parámetros seminales considerados suficientes. Los resultados obtenidos tras la IA de siete vacas con semen recongelado del toro que mejores resultados de fertilidad *in vitro* presentó fue del 71,43 % cuando se realizó el diagnóstico de gestación a los 45 días, y del 57,14 % cuando se realizó el diagnóstico de gestación a los 60 días. La variabilidad de los valores promedio de los parámetros seminales estudiados *in vitro* indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los seis toros del estudio. El estudio de la calidad seminal tras la recongelación, así como la utilización de la IA con semen recongelado podría ser utilizado para conocer la fertilidad del semental, por tanto, la recongelación espermática podría utilizarse eficazmente para la conservación y recuperación de razas amenazadas como la ML.

Palabras clave: Toro Murciano Levantino, doble congelación, fertilidad *in vitro*, raza amenazada, banco de germoplasma.

Influence of the semen donor on the refreezing of Murciano levantino bovine sperm

Abstract

The Germplasm Bank of the Murciano Levantina (ML) bovine breed contains seven thousand, seven hundred and seventy-five seminal doses, none of which have undergone sperm sexing treatment. The objective of this work is to know the influence of the ML bull on the seminal refreezing process. For this study, six ML bulls, declared threatened breed, were used as semen donors, where the seminal doses obtained were frozen and thawed using a conventional method; then refrozen and assessed by *in vitro* and *in vivo* fertility studies (artificial insemination-AI). The results obtained allow us to study fertility *in vitro*

* Autor para correspondencia: laura.almela@carm.es

with results of seminal parameters considered sufficient. The results obtained after the AI of seven cows with refrozen semen from the bull that presented better fertility results *in vitro* was 71.43 % with pregnancy diagnosis at 45 days, and 57.14 % when the diagnosis was made at 60 days. The variability of the average values of the seminal parameters studied *in vitro* indicates significant differences ($p < 0.05$) among the six bulls in the study. The study of semen quality after refreezing, as well as the use of AI with refrozen semen could be used to determine the fertility of the bull, therefore, the seminal refreezing process could be used effectively for the conservation and recovery of threatened breeds such as ML.

Keywords: Murciano Levantino bull, double freeze, *in vitro* fertility, threatened breed, germplasm bank.

Introducción

La conservación de las razas animales es necesaria por múltiples razones, entre ellas, para frenar la pérdida de material genético utilizado habitualmente en tiempos pasados (Almela, 2006).

La raza bovina Murciano Levantina (ML), también denominada "Levantina" o "Huertana", es una raza originaria de la Región de Murcia cuya aptitud principal fue la de animal de tracción, y por tanto, destinada a la realización de trabajo tanto en el ámbito rural como en el urbano. La decadencia de esta raza comenzó a mediados del siglo XX, debido, principalmente, a la merma de utilidad como consecuencia de la introducción de la maquinaria agrícola y de tracción, lo que condujo a una acusada disminución del número de ejemplares que la componían (Almela, 2006). Actualmente, la vaca ML está declarada "raza amenazada" según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 1985), encontrándose el censo actual en 22 animales totales.

En el año 1984 se creó, como medida de mantenimiento, conservación y recuperación de la raza, un Banco de Germoplasma para el almacenamiento de dosis seminales en el antiguo Centro de Selección y Reproducción Animal de Guadalupe-Murcia (CENSYRA). En la actualidad, éste se encuentra en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), manteniéndose mediante proyectos de investigación dedica-

dos a la conservación de recursos zoogenéticos, donde se tiene criopreservado el semen de quince toros de la raza y embriones para su futura recuperación en caso de ser necesario (Almela, 2014).

Estos proyectos permiten una conservación *in situ* (con la participación de los criadores asociados- GANACULTURA) y *ex situ* (criopreservación espermática y puesta a punto de diversas técnicas, entre ellas, la fecundación *in vitro*) (Almela, 2006).

Dentro de la conservación *ex situ*, la recongelación espermática podría mejorar las probabilidades de fertilización cuando el semen esté criopreservado en grandes cantidades, en suministros limitados, se trate de un semen muy valioso o haya sido descongelado por equivocación (Owiny *et al.*, 2010). Así, uno de los objetivos de la recongelación sería el de sexar los espermatozoides entre ciclos de congelación-descongelación (Vázquez *et al.*, 2009). Además, la recongelación espermática también podría solucionar los problemas derivados del transporte a grandes distancias, tales como el tiempo de manejo de las muestras o la temperatura de almacenamiento (Álvarez-Rodríguez, 2012).

Con todo esto, el objetivo del presente trabajo sería el de conocer si existe algún tipo de influencia de los sementales utilizados en este estudio sobre la recongelación espermática, lo que permitiría aplicar esta técnica a esta raza declarada amenazada en un futuro, así como a otras en su misma situación.

Material y métodos

Animales utilizados

Para la realización de este trabajo se utilizaron seis toros de la raza bovina Murciano Levantina en diferentes estados de pureza racial (Figura 1), e inscritos dentro del Libro Ge-

nealógico de la raza. Los toros ML2, ML8, ML9 y ML11 se encontraban entre los 2 y 4 años de edad, mientras que los toros ML3 y ML5 superaban los 4 años. El número de ejemplares elegido para el estudio es representativo y suficiente para la realización del mismo, dado el escaso número total de animales existente de esta raza amenazada.



Figura 1. Toro de la raza Murciano Levantina.
Figure 1. Murciano Levantina breed bull.

Recolección y procesamiento del semen

Para la extracción seminal se utilizó un electroeyaculador (*ElectroJac 5*, Ideal® Instruments). Los eyaculados se recogieron con un colector de semen. A continuación, el semen se depositó en un tubo de recogida atemperado para evitar cambios bruscos de temperatura que pudieran mermar la calidad del eyaculado. Para una primera selección de los eyaculados, se midieron el color y el olor de forma subjetiva descartando aquellos eyaculados no acordes con lo esperado, así como la evaluación de la motilidad masal de forma subjetiva bajo microscopio óptico (Leica, DM-2000) con platina térmica y a 100X para determinar el movimiento en masa de los espermatozoides según Vera Muñoz (2003). Se

midieron los parámetros: volumen del eyaculado y concentración espermática; también se analizaron: motilidad individual y porcentaje de espermatozoides vivos, utilizándose para el estudio sólo aquellos eyaculados que presentaron como mínimo un 50 % de espermatozoides, con movimiento rectilíneo progresivo por encima de 3. El volumen fue medido en tubo aforado y la concentración con fotómetro *Spermacue®* (*Minitübe*, Alemania), a partir de los cuales se calculó el número de dosis seminales a preparar, así como la cantidad de diluyente (diluyentes I y II) a añadir siguiendo el protocolo de congelación descrito por Watson (1976) y el MAPA (1985) y ajustando la concentración de cada dosis seminal de 0,5 ml a 40×10^6 de espermatozoides totales.

Una vez evaluado el semen, las pajuelas de 0,5 ml (utilizadas para envasar el material seminal) se identificaron según Real Decreto 841/2011 (BOE, 2011). El semen junto al diluyente fue envasado mediante sistema semi-automático y sellado con bolas de acero (*Minütube*, Alemania). La criopreservación se realizó siguiendo el protocolo de congelación descrito por Watson (1976) y el MAPA (1985), utilizando un biocongelador programable "*Computer Controlled Rate Freezer 14S SY-LAB. Icecube*" (*Minütube*, Alemania), siguiendo la curva de temperaturas que se describe a continuación: temperatura de inicio a 4 °C; primera rampa de la temperatura de refrigeración de 4 °C hasta -6 °C a una velocidad de enfriamiento de -1 °C/min, en 10 min; mantenimiento de las dosis seminales a -6 °C durante 1 min; de -6 °C hasta -196 °C a una velocidad de -47,50 °C/min, en 4 min. Finalmente, las pajuelas se sumergieron y almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido, y se mantuvieron crioconservadas durante más de 10 años.

Para realizar el estudio espermático de las dosis seminales congeladas, éstas se introdujeron en baño termostático a 56 °C durante 12 s (Thilmant, 1997) para la descongelación seminal, y a continuación se mantuvieron en baño termostático a 37 °C en una dilución 1:2 de semen en medio Tyrode (Rigby et al., 2001).

La recongelación espermática se realizó como sigue: se descongelaron 20 pajuelas por semental de 0,5 ml (5 pajuelas para cada uno de los 4 replicados). Las pajuelas se mantuvieron, una vez descongeladas y sin proceder a la apertura de las mismas, a 20 °C durante 30 min seguido de otros 30 min a 4 °C. A continuación, fueron recongeladas en un biocongelador programable siguiendo la misma curva de temperatura utilizada para la primera congelación. Finalmente, todas las pajuelas se sumergieron y almacenaron en contenedores de nitrógeno líquido a -196 °C.

Evaluación del semen congelado y recongelado

Para evaluar la calidad seminal de las pajuelas congeladas y recongeladas, se midieron y compararon parámetros como la motilidad individual, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides con membrana íntegra [eosina-nigrosina (Tartaglione y Ritta, 2004)] y porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro [lectina PNA (*Peanut Agglutinin*)].

La motilidad individual se analizó mediante escala subjetiva (0-5) según movimiento espermático y velocidad (Bonadonna, 1962); el porcentaje de espermatozoides vivos también de forma subjetiva (0-100 %), ambos bajo microscopio óptico de campo claro (Leica, DM-200) y platina térmica a 100X. Para ello, se realizó una dilución 1:2 de semen en medio Tyrode.

Aquellos espermatozoides que mostraron una tinción color rojo o rosado en sus membranas por la acción de la eosina-nigrosina, presentaron membrana dañada. Por el contrario, aquellos espermatozoides que no presentaron ninguna alteración en su membrana, no mostraron color diferente al original. Para realizar esta tinción, se realizaron frotis observados bajo microscopio óptico de campo claro (Leica, DM-2000) a 40X, contando un total de 300 espermatozoides por preparado.

La integridad del acrosoma se estudió utilizando un 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), contando 200 espermatozoides/muestra y realizando una clasificación (Gardón et al., 2001) según la cual: los espermatozoides que no presentaron coloración estaban intactos y los acrosomas que presentaron coloración verde, dañados.

Análisis estadístico

Para averiguar si existían diferencias significativas entre los machos utilizados en el estudio con respecto a las variables analizadas se realizó un análisis estadístico utilizando el programa STATGRAPHICS Centurión XVI.II® para comparar cada macho con las variables seleccionadas, tanto para semen congelado como recongelado. Se utilizó la prueba-F en la tabla ANOVA para determinar si había diferencias significativas entre las medias, el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Prueba de Múltiples Rangos) para determinar qué medias eran significativamente diferentes de otras y para aquellas variables que indicaron algo de no normalidad significativa se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas seguida de la prueba de Shapiro-Wilk.

Estudio de la fertilidad del semen recongelado mediante IA

Para conocer la capacidad fecundante de cada uno de los toros utilizados en este estudio, se inseminaron 7 novillas de 15 meses de edad de la raza Frisona ubicadas en una explotación de Murcia (España). Como paso previo, se realizó la sincronización e inducción a la ovulación de las hembras del estudio mediante dispositivo intravaginal impregnado en progesterona (CIDR®, Zoetis, Francia). Una semana después, se les aplicó una dosis de PGF2 α (*Dinoprost; Dinolytic*®, Zoetis, Francia), y un día más tarde, retirada de los dispositivos vaginales. Tras 48 h, las novillas se inseminaron dos veces, con intervalo de 12 h mediante catéter de IA para bovino (*QuickLock Classic, Minitübe*, Alemania). Se utilizó el semen recongelado del toro ML3, ya que fue el toro que mejor calidad seminal presentó respecto al resto según los resultados de calidad seminal.

Las dosis seminales utilizadas para la IA fueron transportadas a la explotación en conte-

nedor de nitrógeno líquido. La descongelación se realizó a 37 °C durante 1 min. Cada novilla fue inseminada con 40 x 10⁶ espermatozoides/pajuela de 0'5 ml.

Para comprobar la efectividad de la IA, se realizó el diagnóstico de gestación a los 45 días y 60 días mediante ultrasonografía transrectal con ecógrafo IMAGO (*ECM*, Francia) dotado de sonda lineal de 5 Mhz a 7'5 Mhz. Aquellas hembras a las que se les detectó vesícula embrionaria y presencia del embrión fueron calificadas como gestantes.

Resultados

Motilidad individual

Los resultados de los parámetros estudiados muestran para la motilidad individual (Figura 2), y comparando el semen congelado con el recongelado, una disminución de este parámetro tras la segunda congelación para todos los sementales estudiados, excepto para ML8 que mantuvo constante el valor, siendo los mejores datos obtenidos los de los sementales ML3, ML5, ML8 y ML9.

Los valores promedio, máximo, mínimo y estadísticos en semen congelado y recongelado se muestran en la Tabla 1. Las diferencias significativas entre semen congelado y recongelado para esta variable en cada uno de los sementales se muestran en la Figura 2, donde excepto los sementales ML3 y ML8, el resto presenta diferencias estadísticamente significativas.

Porcentaje de espermatozoides vivos

La supervivencia espermática (Figura 3) fue más elevada en el caso de los espermatozoides que fueron sometidos a una sola congelación, destacando también las pocas diferencias existentes en los valores obtenidos para la congelación entre los diferentes sementales, al con-

Tabla 1. Valores promedio, máximo, mínimo y estadísticos en semen congelado y recongelado.
 Table 1. Average, maximum, minimum and statistical values in frozen and refrozen semen.

	Motilidad individual		Espermatozoides vivos (%)		Integridad membrana (%)		Acrosomas íntegros	
	R	C	R	C	R	C	R	C
Promedio (%)	3,58	4,08	39,29	60	34,86	53,26	50,88	61,43
Max (%)	4,12	4,5	56,25	65	56,2	69,7	78	77
Min (%)	2,75	3	15,75	50	21,9	41,4	23,4	56
S.D.	0,65	0,58	14,58	5,48	10,60	13,45	20,36	8,68
C.V. (%)	18,12	14,30	37,11	9,12	38,4	19,9	40,01	14,29

R: semen recongelado; C: semen congelado; Max: valor máximo; Min: valor mínimo; S.D.: Desviación típica; C.V.: coeficiente de variación.

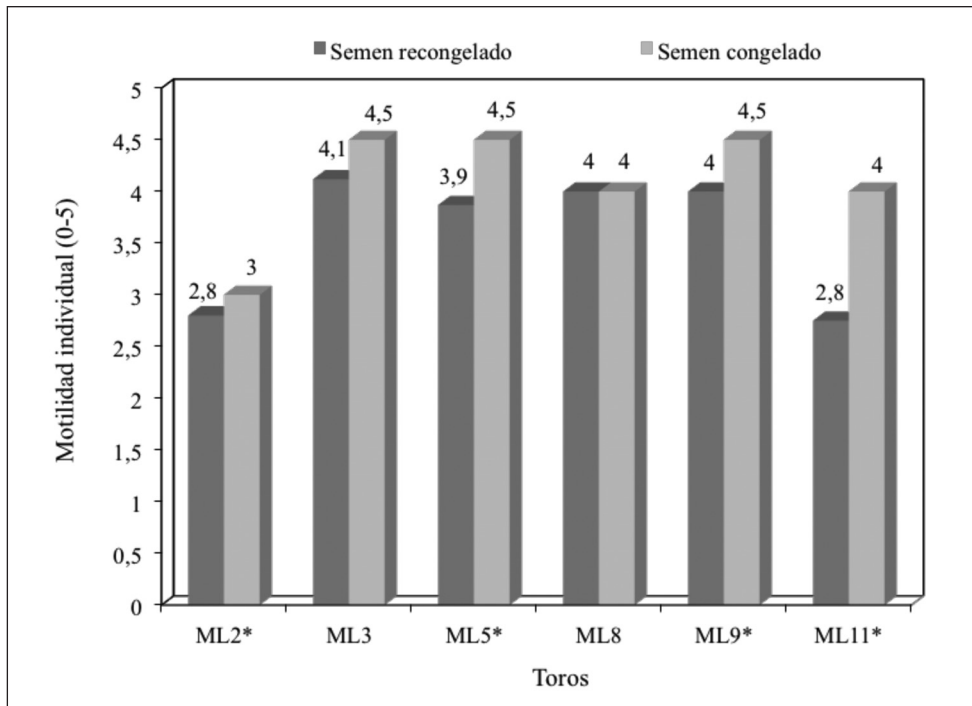


Figura 2. Motilidad individual en semen congelado y recongelado (valores promedio).
 * Indica diferencias significativas.

Figure 2. Individual motility in frozen and refrozen semen (mean values).

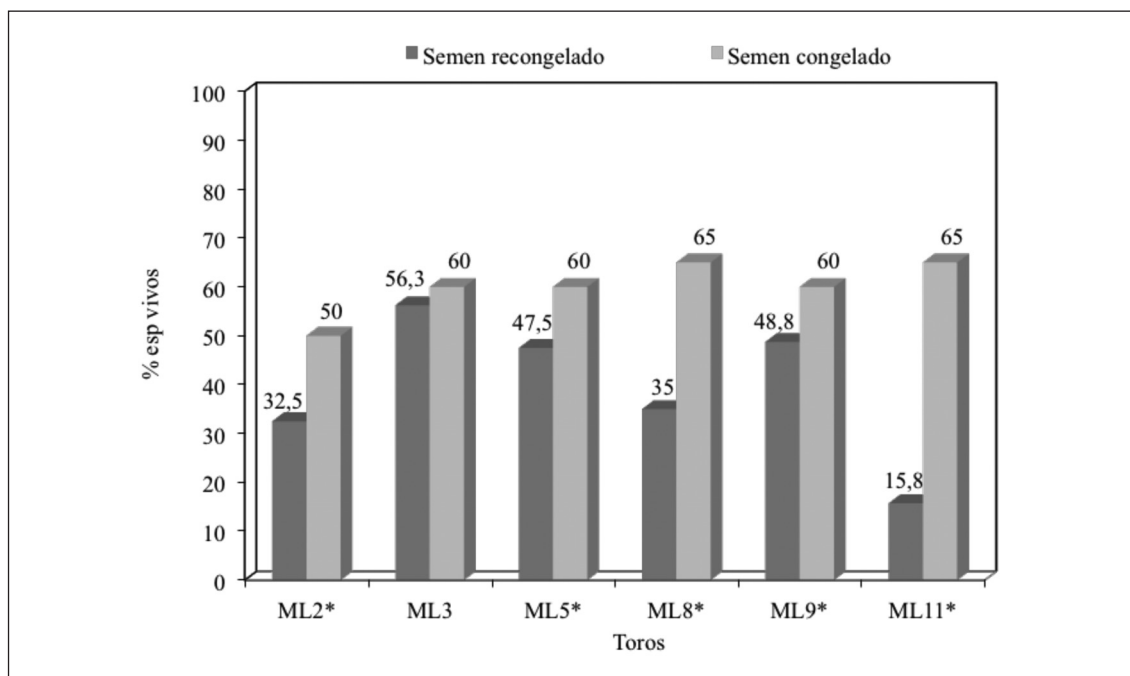


Figura 3. Porcentaje de espermatozoides vivos en semen congelado y recongelado (valores promedio).

* Indica diferencias significativas.

Figure 3. Percentage of live sperm in frozen and re-frozen semen (average values).

trario de lo que sucede en la recongelación, cuyos valores fueron más dispares. De los sementales analizados, ML3 mostró el mejor valor para semen recongelado (56,3 %). Los toros ML8 y ML11 mostraron los valores más elevados en cuanto a semen congelado (65 %).

En la Figura 3 se representan las diferencias estadísticamente significativas entre semen congelado y descongelado para cada uno de los sementales, siendo el toro ML3 el único que no presenta diferencias significativas para este parámetro. Los valores promedio, máximos, mínimos y estadísticos se muestran en la Tabla 1.

Integridad de la membrana espermática

En general, la integridad de la membrana plasmática (Figura 4) mostró mejores valores en

semen congelado. En concreto, el toro ML9 (69,7 %), seguido de ML3 (61,4 %). Los peores resultados se observaron en el semental ML8, con un 41,4 %.

Por otra parte, en semen recongelado se obtuvieron resultados superiores para los ejemplares ML3 (56,2 %) y ML9 (46,03 %), estando el resto de sementales por debajo de éstos y con valores muy similares.

Los valores promedio, máximos, mínimos y estadísticos en semen congelado y recongelado se muestran en la Tabla 1. Las diferencias estadísticamente significativas de cada uno de los toros para esta variable en semen congelado y recongelado se representan en la Figura 4, siendo el semental ML3 el único que no las muestra.

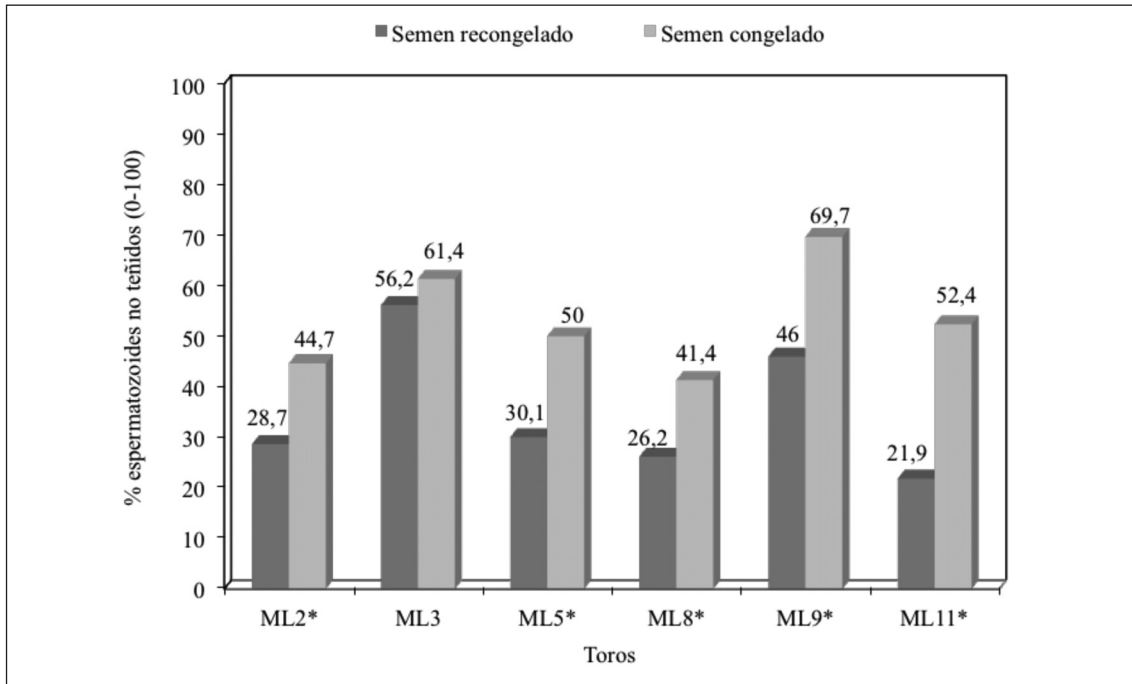


Figura 4. Integridad de la membrana espermática en semen congelado y recongelado mediante la tinción de eosina-nigrosina (valores promedio).

* Indica diferencias significativas.

Figure 4. Percentage of plasma membrane integrity in frozen and refrozen semen (average values).

Estudio del acrosoma

El estudio de los acrosomas espermáticos del semen de los toros ML se representa en la Figura 5. En ella se muestra en general una mayor concentración de espermatozoides con el acrosoma intacto en semen congelado que en recongelado, a excepción de los toros ML3 y ML9 cuya cantidad de acrosomas íntegros es superior en semen recongelado. En ML9 el porcentaje en semen recongelado (71,1 %) fue superior al de semen congelado (56 %). Siendo en el caso de ML3 los valores de semen congelado (77 %) y recongelado (78 %) muy similares. Los datos más elevados y por tanto mejores, fueron los del semental ML3 y los más bajos los del ejemplar ML8 (23,4 % semen recongelado y 56 % semen congelado).

Los valores promedio, máximos, mínimos y estadísticos en semen congelado y recongelado se presentan en la Tabla 1. La comparación de semen congelado y recongelado para cada uno de los toros para esta variable indica que todos excepto ML3 muestran diferencias significativas (Figura 5).

Estudio estadístico comparativo entre machos

Aquellas variables que indicaron algo de no normalidad significativa en los datos fueron “porcentaje de espermatozoides vivos en semen recongelado” y “motilidad individual en semen recongelado”.

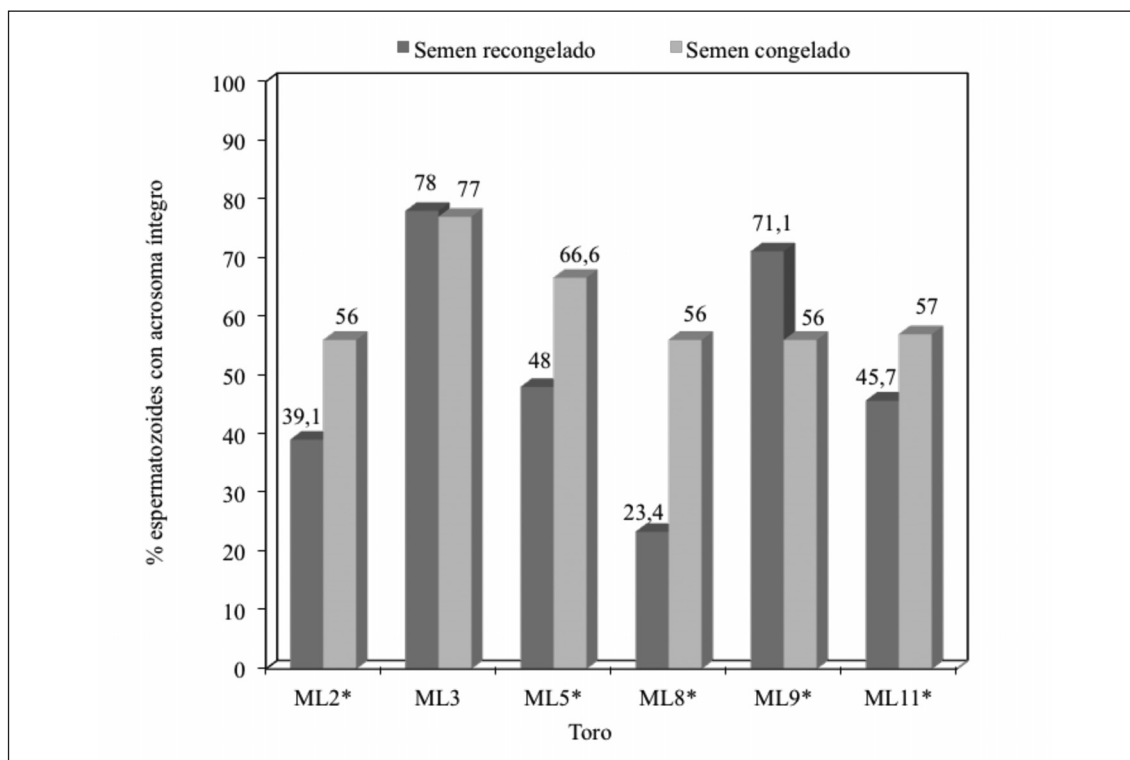


Figura 5. Estudio de los acrosomas espermáticos en semen congelado y recongelado mediante lectina PNA.
* Indica diferencias significativas.

Figure 5. Study of sperm acrosomes in frozen and re-frozen semen using PNA lectin.

Las diferencias significativas entre sementales para cada una de las variables objeto del estudio se muestran en la Tabla 3.

Inseminación artificial

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la inseminación artificial de las 7 novillas Frisonas utilizadas en este ensayo.

Dada la presencia de síntomas de celo en todas las hembras tras la sincronización, se realizaron dos inseminaciones artificiales (IA), con intervalo de 12 h. De las 7 novillas inseminadas, dos (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.

Dada la ausencia de síntomas de celo en las cinco novillas IA tras 45 días, se les realizó una ecografía, resultando gestación positiva en un 71,43 %.

Se efectuó una segunda ecografía para confirmar la primera tras 60 días post-IA. Como resultado 1 de las 5 novillas diagnosticadas gestantes en la primera ecografía se diagnosticó como no preñada, por lo que 4 hembras de las 7 totales continuaron estando gestantes tras 60 días, por lo que el porcentaje de fertilidad del semen recongelado fue del 57,14 %.

Tabla 2. Sincronización e inseminación artificial (IA) con semen recongelado en novillas Frisonas.

Table 2. Synchronization and artificial insemination (IA) with frozen semen in Friesian heifers.

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

Tabla 3. Diferencias significativas entre sementales para cada variable.

Table 3. Significant differences between bulls for each variable.

Sementales	% esp. Vivos		Mot. Ind.		Int. Memb.		Acros.	
	C	R	C	R	C	R	C	R
ML2-ML3	*	*	*	*	*	*	*	*
ML2-ML5	*	*	*	*	*		*	*
ML2-ML8	*		*	*	*			*
ML2-ML9	*	*	*	*	*	*		*
ML2-ML11	*	*	*	*	*	*		*
ML3-ML5		*			*	*	*	*
ML3-ML8		*	*		*	*	*	*
ML3-ML9		*			*	*	*	*
ML3-ML11		*		*	*	*	*	*
ML5-ML8		*	*		*		*	*
ML5-ML9					*	*	*	*
ML5-ML11		*		*	*	*	*	
ML8-ML9		*	*		*	*		*
ML8-ML11		*		*	*			*
ML9-ML11		*		*	*	*		*

* Indica una diferencia significativa; C: semen congelado; R: semen recongelado; esp.: espermatozoides; Mot. ind.: Motilidad individual; Int. Memb.: Integridad de Membrana; Acros.: Acrosomas.

Discusión

Lömker y Simon (1994), Danchi-Burge *et al.* (2001) y Gandini *et al.* (2007) recomendaron tener el semen de al menos veinticinco machos no emparentados almacenados en el Banco de Germoplasma para mantener el 98 % de heterocigosidad de la población. Sin embargo, Hiemstra *et al.* (2005) creen que este valor es innecesariamente alto y difícil de alcanzar en el caso de razas en peligro de extinción, ya que el número de animales disponibles es pequeño; como es el caso de la raza ML.

Los programas de conservación llevados a cabo por Crespo García (2003) y Tamargo *et al.* (2009) recomiendan mantener un total de quinientas dosis seminales/toro. De todos los toros criopreservados en el Banco de Germoplasma utilizados en este estudio, los toros ML2, ML3 y ML5 son los únicos que superan este valor. El resto de animales dentro del programa de recuperación de la raza fueron sacrificados antes de poder realizar extracciones seminales suficientes para poder completar el mínimo recomendado.

Anzar *et al.* (2002) obtuvieron resultados para el porcentaje de espermatozoides vivos en especies bovinas del 80-90 %. En el presente trabajo, los valores obtenidos para este parámetro fueron menores para todos los animales estudiados y para las dos congelaciones realizadas, con valores máximos y mínimos para el semen congelado del 65 % y 50 %, y para el semen recongelado del 58,75 % y 21,25 %. Estas diferencias podrían deberse a la calidad seminal inicial en fresco, a una cuestión racial e incluso a la consanguinidad existente entre los toros en estudio.

Saragusty *et al.* (2009) realizaron la congelación y recongelación de semen de toro Holstein. Para el parámetro de motilidad espermática en doble congelación, los resultados obtenidos fueron considerablemente inferiores a los obtenidos para una sola congelación. Además, cuando se evaluó el paráme-

tro de motilidad después de la congelación de los espermatozoides, se encontraron diferencias significativas entre toros (50-80 %) y también en la recongelación de semen (20-40 %); datos que coinciden con los encontrados en nuestro estudio.

Según Lozano (2009) las diferencias significativas encontradas entre sementales respecto a la congelabilidad seminal en el presente estudio se podrían explicar por factores tales como la edad (que en nuestro caso oscilaron entre los 2 y los 4 años, incluso más), la estación del año en que se realizó la extracción seminal, el estado nutricional del semental en el momento de la extracción e incluso debido a las características propias del individuo, entre otros.

Dentro del experimento realizado por McCue *et al.* (2004b), en el que se volvió a congelar semen equino, se encontraron resultados de motilidad espermática del 64,2 % en congelación y del 45,7 % con la doble congelación, produciendo así una disminución de la motilidad espermática tras la segunda congelación, como es el caso de nuestro estudio. Estos mismos autores observaron después de congelar y volver a congelar semen bovino, que la motilidad era mucho mayor en el semen congelado que en el semen congelado por segunda vez, resultados que también coinciden con los obtenidos en nuestro trabajo para algunos toros ML utilizados en este estudio (McCue *et al.*, 2005).

Verza y Estevez (2004) llevaron a cabo un experimento en el que se recongelaron espermatozoides humanos, resultando en una disminución significativa de la motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos entre la primera y la segunda descongelación, lo que reafirma nuestros resultados a pesar de no ser de la misma especie o el mismo proceso de congelación seminal.

En otras especies como equino, como resultado del estudio de la viabilidad de la membrana espermática (por tinción con yoduro de

propidio) en semen recongelado, se observó una disminución de este parámetro (McCue et al., 2004a), resultados que coinciden con los encontrados en el presente estudio.

En los estudios realizados por Hollinshead et al. (2004a,b), en el que se realizó sexado y recongelación en espermatozoides de carnero y toro y en el que se estudió el estado de los acrosomas, se encontró una menor proporción de acrosomas intactos en ambas especies tras estos procesos, lo que se explica por el daño que estas técnicas pueden producir en el espermatozoide. En nuestro estudio, la proporción de espermatozoides con acrosomas intactos también fue mayor en el semen congelado que en el semen recongelado, con la excepción de los toros ML9 y ML3.

Por lo tanto, la pérdida de vitalidad y motilidad de los espermatozoides, el aumento de las morfoanomalías, los acrosomas dañados y la disminución de la fertilidad son resultados considerados normales después de descongelar las dosis seminales (Chauhan et al., 1994; Correa et al., 1996). Los procesos de refrigeración, congelación y descongelación pueden provocar graves alteraciones en el acrosoma, que suelen conducir a una baja fertilidad (Peña y Linde-Forsberg, 2000).

El porcentaje de fertilidad obtenido después de utilizar el semen recongelado fue del 57,14 %. Underwood et al. (2010) afirman que la baja fertilidad del semen recongelado podría deberse a la disminución de la motilidad del esperma y su velocidad, lo que reduciría el número de espermatozoides viables presentes en el oviducto en el momento de la ovulación. Sin embargo, Arav et al. (2002) realizaron la IA a un grupo de vacas con semen congelado y a otro grupo con semen recongelado, resultando en un 45,5 % y 44 % de fertilidad, respectivamente, superando nuestros datos a los de estos autores, lo que se explicaría por el mayor número de hembras utilizadas en este ensayo.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados de nuestro estudio, la integridad de la membrana espermática del semen congelado resultó menos dañada que la del semen recongelado en todos los ejemplares estudiados.

Se ha visto que existen diferencias sustanciales respecto al espermiograma entre los distintos toros estudiados. Por lo tanto, el estudio de la calidad seminal tras la recongelación espermática se podría utilizar para predecir la fertilidad; es decir, cuanto mejores sean los resultados del semen recongelado *in vitro*, mejores serían los resultados de fertilidad *in vivo* del semen congelado para cada uno de los sementales.

Además, se podría concluir que la inseminación artificial con semen recongelado podría ser una herramienta eficaz para el conocimiento de la fertilidad del semental.

Por tanto, según los datos obtenidos, la recongelación espermática podría utilizarse como instrumento útil y eficaz para la conservación y recuperación de la raza bovina ML.

Agradecimientos

Al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA, Murcia, España).

Al proyecto RZ2010-00003-C02-02 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, España).

Al Proyecto FEDER 1420-11. Las Razas Autóctonas de la Región de Murcia. Estudio de derivados alimenticios alternativos.

Al Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia, Campus de Espinardo. España.

Referencias bibliográficas

- Almela L (2006). Estudio sobre la situación actual de cuatro razas en peligro de extinción en la Región de Murcia: cerdo Chato Murciano, vaca Murciana, gallina Murciana y cabra Blanca Celtibérica. Trabajo Fin de Carrera. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Universidad Miguel Hernández. Orihuela, Alicante, España.
- Almela L (2014). Aportaciones a la crioconservación de gametos masculinos en la raza bovina Murciano Levantina: recongelación de espermatozoides. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Álvarez-Rodríguez M (2012). Mejora y evolución de los protocolos de congelación de eyaculados de oso pardo (*Ursus arctos*). Tesis Doctoral. Universidad de León (España).
- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biology of Reproduction* 66: 354-360. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.2.354>.
- Arav A, Zeron Y, Shturman H, Gacitua H (2002). Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. *Reproduction Nutrition Development* 42: 583-586. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002044>.
- BOE (2011). Real Decreto 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 y porcina, y de los équidos. Boletín Oficial del Estado, núm. 168, de 14 de julio de 2011.
- Bonadonna T (1962). Fisiopatología de la reproducción y fecundación artificial ganadera. Salvat. Barcelona, España. 769 pp.
- Chauhan MS, Kapilar R, Gandhi KK, Anand SR (1994). Acrosome damage and enzyme leakage of goat spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Andrologia* 26: 21-26. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1994.tb00748.x>.
- Correa JR, Rodríguez MC, Patterson DJ, Zavos PM (1996). 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. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00163-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00163-x).
- Crespo García MJ (2003). Conservación "Ex Situ" mediante la utilización de técnicas de reproducción animal asistida, y tipificación genética de las razas bovinas Tudanca y Monchina en Cantabria. Disponible en: <https://cifacantabria.org/Documentos/CONSERVACION.pdf> (consultado: 21 abril 2021).
- Danchi-Burge C, Bibé B, Planchenault D (2001). La cryobanque nationale: mise en place d'une cryocollection patrimoniale des races d'animaux d'élevage. *Proc 4ème Coll BRG, La Châtre, Francia*, pp. 111-113.
- Gandini GC, Pizzi F, Stella A, Boettcher PJ (2007). The costs of breed reconstruction from cryopreserved material in mammalian livestock species. *Genetics Selection Evolution* volumen 39: 465. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-39-4-465>.
- Gardón JC, Matás C, Gadea J (2001). Efecto del protocolo de preparación de los espermatozoides bovinos sobre el patrón de reacción acrosómica. *Anales de Veterinaria de Murcia* 17: 19-26.
- Hiemstra SJ, Van Der Lende T, Woelders H (2005). The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. En: *The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resources*. FAO. Rome (Italy), pp. 25-35.
- Hollinshead FK, Evans G, Evans KM, Catt SL, Maxwell WMC, O'Brien JK (2004a). 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. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00049>.
- Hollinshead FK, O'Brien JK, Maxwell WMC, Evans KM (2004b). Assessment of *in vitro* sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology* 62: 958-968. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.030>.

- Lömker R, Simon DL (1994). Costs of and inbreeding in conservation strategies for endangered breeds of cattle. Proceedings 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Productions. 7-12 agosto, Nebraska (USA) 21: 393-396.
- Lozano H (2009). Factores que afectan la calidad seminal en toros. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia 56: 258-272.
- McCue PM, Kelly JM, Moore AI, Bruemmer JE, Walker SK (2004a). Refrozen semen: sperm characteristics in horses and *in vitro* embryo production in ruminants. Proceeding of the 6th International Symposium on Equine Embryo Transfer, 4-6 agosto, Rio de Janeiro, Brazil.
- McCue PM, Moore AI, Bruemmer JE (2004b.) Refreezing stallion spermatozoa for assisted reproduction. Reproduction, Fertility and Development 16: 176-177. <http://dx.doi.org/10.1071/RDv16n1Ab109>.
- McCue PM, Kelly J, Ashworth S, Kleemann D, Walker S (2005). Effect of refreezing bull semen on IVF success rate. Reproduction, Fertility and Development 17: 275-275. <https://doi.org/10.1071/RDv17n2Ab249>.
- MAPA (1985). Manual de normas técnicas para la congelación de semen en la especie bovina. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de la Producción Agraria. Subdirección General de la Producción Animal.
- Owiny OD, Barry DM, Godke RA (2010). Effects of repeated freeze-thawing of bovine epididymal sperm on *in vitro* embryo development. African Journal of Animal and Biomedical Sciences 5: 56-64.
- Peña A, Linde-Forsberg C (2000). Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. Theriogenology 54:703-718. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00384-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00384-8).
- Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC, Varner DD (2001). Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. Animal Reproduction Science 68: 171-180. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00154-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00154-3).
- Saragusty J, Gacitua H, Zeron Y, Rozenboim I, Arava A (2009). Double freezing of bovine semen. Animal Reproduction Science 115: 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.11.005>.
- Tamargo C, De La Fuente J, Rodríguez A, Pérez-Garnelo SS, Fernández A, Benito JM, Hidalgo CO (2009). Creación en Asturias de un banco de germoplasma de razas autóctonas. Archivos de Zootecnia 1: 529-532.
- Tartaglione CM, Ritta MN (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. Theriogenology 62: 1245-1252. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.012>.
- Thilmant P (1997). Congélation du Sperme de Verrat en Paillette de 0.5 ml. Résultats sur le Terrain. Annales de Médecine Vétérinaire 141: 457-462.
- Underwood SL, Bathgate R, Maxwell WMC, Evans G (2010). Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, refrozen- thawed bull sperm. Animal Reproduction Science 118:171-175. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.08.007>.
- Vázquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vázquez JL, Martínez EA (2009). Sexorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. Theriogenology 71: 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.044>.
- Vera Muñoz O (2003). Evaluación seminal comparativa pre y pos congelación en machos bovinos. En: Reproducción Bovina. (Ed. González-Stagnaro C.), pp. 251-262. Astro-Data. Maracaibo (Venezuela).
- Verza S, Esteves SC (2004). Feasibility of refreezing human spermatozoa through the technique of liquid nitrogen vapour. International Brazilian Journal of Urology 30: 487-493. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-55382004000600006>.
- Watson PF (1976). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein factor of egg yolk during storage at 5 °C and deep-freezing. Journal of Thermal Biology 1: 137-141. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(76\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0306-4565(76)90003-6).

(Aceptado para publicación el 17 de enero de 2022)