

Uso del test de termorresistencia para evaluar la viabilidad del semen congelado de los toros del Banco Nacional de Semen

Use of thermoresistance test to evaluate the viability of frozen semen from the national semen bank bulls

K.J. Farroñan-Chapoñan^{1,a,*}, B.D.P. Colter-Apaza^{1,b}, A.D.P. Gallegos-Cardenas^{2,c,*}, F.C. Trillo-Zarate^{2,d}, P.A. Del Carpio-Ramos^{1,e}

¹ Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Lambayeque, Perú.

² Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

^a Ing., ✉ jackelinefarronan@gmail.com,  <https://orcid.org/0009-0004-7903-8104>

^b Mg., ✉ bcolter@unprg.edu.pe,  <https://orcid.org/0000-0001-8388-0098>

^c Ph.D., ✉ amgallegos@lamolina.edu.pe,  <https://orcid.org/0000-0003-1408-7429>

^d Ph.D., ✉ frillo@lamolina.edu.pe,  <https://orcid.org/0000-0002-4763-3433>

^e Dr., ✉ pdelcarpio@unprg.edu.pe,  <https://orcid.org/0000-0002-0236-1593>

* Autor de Correspondencia: Tel. +51 971792372

<http://doi.org/10.25127/riagrop.20243.1014>

<http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/RIAGROP>
revista.riagrop@untrm.edu.pe

Recepción: 08 de abril 2024

Aprobación: 15 de junio 2024

Este trabajo tiene licencia de Creative Commons.
Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0
International Public License – CC-BY-NC-SA 4.0



Resumen

Se evaluó el semen de toros Holstein y Brown Swiss con el objetivo de determinar la viabilidad mediante la motilidad espermática en función del tiempo post descongelado utilizando el test de termorresistencia (TT). Se emplearon cuatro sementales (2/raza) para evaluar: motilidad espermática progresiva (MP), rápida (MR), lenta (ML) y circular (MC) en diferentes tiempos post descongelado; también se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Para MP se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre razas (Holstein > Brown Swiss) y entre momentos post descongelado, a partir de los 30 minutos la motilidad desciende ($P < 0.05$) conforme se incrementa el tiempo desde el descongelado; comportamiento similar se vio para MR. La ML mostró diferencia entre razas ($p < 0.05$), pero desapareció en tiempo post descongelado ($p > 0.05$). La MC fue diferente entre razas, Holstein superó a Brown Swiss ($P < 0.05$), y hubo diferencias entre tiempos post

descongelación ($p<0.05$) con una tendencia a disminuir conforme transcurrió el tiempo. Mayor proporción de espermatozoides inmóviles hubo en Brown Swiss ($p<0.05$), incrementándose conforme transcurrió el tiempo post descongelado ($p<0.05$). En conclusión, el TT permitió determinar que el semen de toros Holstein tuvieron mejores características de motilidad, las que tienden a empeorar conforme transcurre el tiempo post descongelado de las pajuelas.

Palabras claves: Motilidad; vitalidad; test; termorresistencia.

Abstract

Semen of Holstein and Brown Swiss bulls were evaluated with the aim of determining viability through sperm motility as a function of post-thawing time using the thermoresistance test (TT). Four stallions were used (2/breed) to evaluate: progressive (PM), fast (FM), slow (SM) and circular (CM) sperm motility on different post-thawing times; the percentage of live sperm was also determined. Significant differences were found for PM ($p<0.05$) between breeds (Holstein>Brown Swiss) and post-thawing moments; after 30 minutes, motility decreases ($P<0.05$) as the time since thawing increases; similar behavior was found on FM. SM showed differences between breeds ($p<0.05$), but it disappeared in post-thawing time ($p>0.05$). CM was different between breeds, Holstein surpassed Brown Swiss ($P<0.05$), and there were differences between post-thaw times ($p<0.05$), with a tendency to decrease as time passed. There was a greater proportion of immotile spermatozoa in Brown Swiss ($p<0.05$), increasing as the post-thawing time elapsed ($p<0.05$). In conclusion, the TT allowed us to determine that semen of Holstein bulls had better motility characteristics, which tend to worsen as the straws post-thawing time passes.

Keywords: Motility; viability; test; thermoresistance.

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances en los programas de transferencias de embriones en vacunos, la inseminación artificial (IA) aún representa la principal forma de asistencia reproductiva en ganado siendo una de las estrategias de más bajo costo para incrementar el mérito genético en los establos. La IA tiene muchas ventajas en comparación a la monta natural; tales como, el control de enfermedades infecciosas, mejoras en el manejo reproductivo y un estricto control de las características zootécnicas y económicas del ganado (Emerick et al., 2011).

Para consolidar la ventaja del empleo de la IA los centros de producción de semen deben suministrar pajillas que contengan

espermatozoides de buena viabilidad y que produzcan tasas de concepción aceptables, si es que todas las otras variables se controlan correctamente (Peláez et al., 2006). Los principales indicadores de la calidad son motilidad, integridad de membrana citoplasmática y la morfología del acrosoma. Sin embargo, ciertas técnicas utilizadas en la evaluación de estos parámetros no podrían proporcionar una estimación precisa de la calidad (Peláez et al., 2006). De hecho, varios estudios han demostrado claramente que los indicadores convencionales no se correlacionan con la fertilidad *in vivo* (Brahmkshtri et al., 1999), o no pueden explicar las diferencias en la capacidad fertilizante *in vitro* (Martínez et al., 1993; Xu et al., 1998).

Por lo expuesto, se han desarrollado procedimientos para evaluar el semen que son más precisos en la determinación de la calidad. Entre los que se encuentra el Análisis de Semen Asistido por Computadora (CASA) y el Test de Termorresistencia (TT), este último permite evaluar semen fresco o después de la descongelación; en términos generales, el procedimiento consiste en incubar muestras de semen descongeladas a 38°C durante 5 h (prueba lenta) o a 46° C durante 30 minutos (prueba rápida), después de cualquiera de las pruebas, el semen descongelado debe tener al menos un 15% de motilidad y el semen fresco debe tener al menos un 70% de motilidad para ser considerado de buena calidad (Peláez et al., 2006; Talín et al., 2019).

Se ha establecido que la motilidad es el indicador más utilizado para determinar la calidad y viabilidad del semen después de la descongelación y su relación con la fertilidad en el campo; no obstante, a veces la respuesta no se da (Amann, 1987; Farrell et al., 1998; Rodríguez-Martínez, 2003; Emerick et al., 2011).

Con relación al test de termorresistencia (TT), Talín et al. (2019) modificaron los protocolos y emplearon 3 pruebas de termorresistencia lenta (STT1, 60min/38 °C; STT2, 180min/38 °C y STT3, 300min/38 °C); no encontraron correlación positiva entre la viabilidad espermática y la fertilidad en campo, los autores indicaron que una de las razones para este resultado pudo ser el tiempo largo de incubación (más de tres horas) utilizado al realizar el TT. Dado que el TT no se ha empleado en el Banco Nacional de Semen (BNS) cabe preguntar ¿Habrá diferencia en calidad del semen, evaluado mediante TT, a diferentes momentos después de la descongelación, en sementales de las razas Holstein y Brown Swiss del BNS?

Para encontrar una respuesta se realizó la presente investigación, cuyo objetivo fue evaluar la viabilidad del semen congelado de toros de raza Holstein y Brown Swiss utilizando el test de termorresistencia en diferentes momentos después de la descongelación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales y manejo

El ensayo se realizó en el Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional La Molina – Lima, entre los meses de Junio y Noviembre de 2019. Se utilizaron 4 sementales, 2 de la raza Holstein (América y Vichama) y 2 de la raza Brown Swiss (Aníbal y Bolt). Se realizaron 10 colecciones de semen por toro y 2 pajillas de semen por cada colección.

Los toros permanecieron en boxes individuales de material noble y madera, provistos de sombra, así como adecuada iluminación y ventilación, con comedero para el suministro del alimento y bebedero. La alimentación de los toros estuvo basada en forraje verde picado de maíz chala (50 kg/animal/día) y se suplementó con concentrado (4 kg/animal/día) y agua *ad libitum*. El aporte de proteína se estimó en 14.0%, fibra cruda 17.5% y NDT 68.5%.

2.2. Colección de semen y evaluación

Para la colección de semen, se usó un brete de monta cuyas dimensiones fueron: largo 3.0m, ancho 1.50m y alto 1.80m. Un día antes de la colección se esterilizaron y prepararon los materiales de laboratorio: vagina artificial, tubos de ensayo, matraces, bandejas, clips impresos con los respectivos nombres del toro a coleccionar. La colección del semen se hizo con vagina artificial y se trasladó al laboratorio,

manteniéndose a una temperatura de 38 °C; para el procesamiento de semen se atemperaron las muestras a 34°C en un baño maría. Las características seminales evaluadas fueron: Volumen del eyaculado, color, motilidad individual, por observación directa y concentración espermática mediante el equipo fotométrico y las diferentes motilidades de los eyaculados seleccionados para congelación fueron analizados con el sistema CASA. Se empajilló (0.5cc) y se congelaron las muestras seminales en un tanque de nitrógeno líquido.

Para realizar el test de termorresistencia lento, las pajillas de semen fueron descongeladas e incubadas a 38°C, y las variables de motilidad progresiva, rápida, lenta, circular y el porcentaje de inmóviles fueron evaluadas al momento del descongelamiento, a los 15, 30, 60 y 120 minutos; el porcentaje de espermatozoides vivos fue evaluado al descongelamiento, a los 60 y a los 120 minutos. La metodología de colección y evaluación de las muestras seminales, fue la misma para cada una de las muestras:

Se trabajó a una temperatura de 23°C en el laboratorio para descongelar las pajillas, utilizando agua (38°C, por 20 segundos), las pajillas se secaron con papel toalla, se cortó y el contenido se introdujo en tubos eppendorf, acondicionada en una platina a 37°C. Las muestras seminales se homogenizaron y se extrajeron 10ul de semen para ser colocados en la lámina porta objetos, se colocó cubreobjetos para ser evaluados en el microscopio. Se usó el sistema CASA para evaluar las variables de interés. El procedimiento de evaluación seminal TT se realizó a los cero, 15, 30, 60 y 120 minutos.

Para la evaluación de la viabilidad se procedió a descongelar la pajilla de semen y se colocó en los tubos eperdonf ubicados en la platina

temperada, inmediatamente se procedió a extraer 10ul de semen con una pipeta y se colocó en la lámina porta objetos; con otros tips se extrajo 10ul de eosina y nigrosina para mezclarlos con las muestras de semen. Inmediatamente se colocó una pequeña muestra de 10ul en la lámina porta objetos y se siguió con otra lamina para hacer el delgado frotis, que se dejaba en la platina caliente para el secado por 5-10 segundos; se procedió a contar el número de espermatozoides vivos y muertos en el microscopio a 40X de aumento, a las cero, una y dos horas.

2.3. Análisis estadístico

Las variables de estudio fueron analizadas bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2 (razas x sementales). Sólo cuando el valor de F resultó significativo se procedió a comparar con la prueba de rango múltiple de Duncan.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La motilidad mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) a favor de la raza Holstein (Tabla 1). Así mismo, se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) en motilidad progresiva, lenta y circular entre momentos, con tendencia a proporciones menores conforme se incrementa el tiempo; no sucedió así con la motilidad lenta y circular, en la que no hubo diferencias significativas ($P > 0.5$) entre los diferentes momentos de evaluación post descongelación (Tabla 2).

Así mismo, en todas las variables de motilidad hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los sementales que participaron en el estudio. En todos los casos la mayor proporción

correspondió a animales de la raza Holstein, como se puede apreciar en la Tabla 3.

La proporción de espermatozoides inmóviles conforme transcurrió el tiempo desde la descongelación, varió desde 22.67 a 30.94%; a los 0, 15 y 30 minutos; las diferencias no fueron significativas, pero fueron inferiores a los valores obtenidos a los 60 y 120 minutos ($P < 0.05$). La proporción de espermatozoides vivos disminuyó conforme se incrementó el tiempo post descongelación, desde 57.78% al minuto cero de descongelación hasta 43.43% a los 120 minutos ($P < 0.05$) (Tablas 4 y 5).

Tabla 1. Motilidad espermática (%) según raza de toros

Motilidad	Razas	
	Holstein	B. Swiss
Progresiva	78.73 ^a	71.24 ^b
Rápida	35.35 ^a	32.67 ^b
Lenta	41.01 ^a	38.59 ^b
Circular	2.34 ^a	0.97 ^b

^{a,b}Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre razas.

Tabla 2. Motilidad espermática (%) según tiempo post descongelación de semen

Tiempo (minutos)	Progresiva	Rápida	Lenta	Circular
0	77.33 ^a ± 3.4	36.67 ^a ± 4.8	38.53 ^a ± 3.1	2.15 ^a ± 1.1
15	77.64 ^a ± 4.1	35.64 ^a ± 4.3	39.93 ^a ± 4.4	2.03 ^a ± 1.4
30	76.52 ^a ± 4.1	35.65 ^a ± 3.4	38.80 ^a ± 2.6	2.03 ^a ± 1.3
60	74.39 ^b ± 4.9	31.99 ^b ± 4.8	40.76 ^a ± 4.3	1.57 ^b ± 1.6
120	69.04 ^c ± 4.7	27.56 ^c ± 3.9	40.97 ^a ± 3.3	0.49 ^c ± 0.2

^{a,b}Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos post descongelación dentro de tipos de motilidad.

Tabla 3. Motilidad espermática (%) de sementales evaluados

Motilidad	Razas			
	Holstein		B. Swiss	
	América	Vichama	Bolt	Aníbal
Progresiva	79.11 ± 4.2 ^a	78.35 ± 2.5 ^a	68.90 ± 4.1 ^c	73.57 ± 2.4 ^b
Rápida	38.67 ± 4.7 ^a	32.02 ± 3.4 ^b	29.77 ± 3.6 ^c	35.56 ± 2.5 ^b
Lenta	36.86 ± 2.0 ^c	45.15 ± 2.4 ^a	40.27 ± 0.8 ^b	36.90 ± 0.6 ^c
Circular	3.50 ± 1.5 ^a	1.17 ± 0.5 ^b	0.84 ± 0.3 ^c	1.10 ± 0.6 ^b

^{a,b}Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sementales dentro de tipos de motilidad.

Tabla 4. Porcentaje de espermatozoides inmóviles y vivos según raza

Motilidad	Razas			
	Holstein		Brown Swiss	
	América	Vichama	Bolt	Aníbal
Espermatozoides inmóviles	20.94 ± 4.2 ^c	21.67 ± 2.4 ^c	31.11 ± 4.1 ^a	26.18 ± 2.1 ^b
Espermatozoides vivos	54.74 ± 5.4 ^a	52.38 ± 7.4 ^a	47.57 ± 5.8 ^a	48.08 ± 4.9 ^a

Tabla 5. Porcentaje de espermatozoides inmóviles y vivos según tiempo post descongelación.

Tiempo (minutos)	Espermatozoides inmóviles	Espermatozoides vivos
0	22.67 ^c (± 3.4)	57.78 ^a (± 3.5)
15	22.57 ^c (± 4.0)	
30	23.67 ^c (± 4.2)	50.87 ^b (± 3.4)
60	25.03 ^b (± 4.8)	
120	30.94 ^a (± 4.8)	43.43 ^c (± 2.7)

^{a,b}Letras diferentes sobre los promedios indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos post descongelación dentro de espermatozoides inmóviles y vivos.

Los resultados obtenidos indican la importancia de considerar el efecto toro, dentro de la raza, a la hora de evaluar los indicadores de calidad seminal; así como el efecto de la raza (Sukirman *et al.*, 2019). Así mismo, el tiempo de descongelación no debe ser superior a los 30 minutos; en todo caso, se aboga porque el servicio se haga lo antes posible después del descongelamiento del semen.

La importancia de la motilidad como un indicador importante de la calidad del semen ha sido resaltada por Fernández-Novo *et al.* (2021), pero que siempre debe complementarse con otros indicadores, como la morfología del semen o el análisis de vitalidad, este último fue utilizado en la presente investigación. Duracka *et al.* (2021) indicaron que de acuerdo a la motilidad la calidad del semen se puede clasificar como excelente si esta es superior a 90%, buena entre 80 y 89% y moderada cuando se determinan valores inferiores a 80%; por lo que los valores encontrados en este ensayo indicaron calidad moderada según la motilidad.

No obstante, la clasificación excelente no es fácil de alcanzar, toda vez que diferentes trabajos de investigación realizados con diferentes razas de ganado y en diversas condiciones han reportado cifras de motilidad parecidos a los encontrados en el presente ensayo (Prihantoko

et al., 2020; Pernas *et al.*, 2023; Panhwar *et al.*, 2024).

4. CONCLUSIONES

El test de termorresistencia permitió determinar diferencias significativas entre razas y sementales en la motilidad espermática evaluada a diferentes momentos después del descongelamiento. La proporción de espermatozoides inmóviles fue menor en los sementales Holstein y se incrementó conforme transcurrió el tiempo desde la descongelación.

Declaración de intereses

Ninguna.

Referencias

- Amann, R.P. & Pickett, B.W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7, 145-173
- Brahmkshtri, B.P., Edwin, M.J., John, M.C., Nainar, A.M. & Krishnan, A.R. (1999). Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro. *Animal reproduction science*, 54(3), 159-168. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(98\)00108-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(98)00108-0)
- Emerick L.L., Dias J.C., Ribeiro do vale filho. V., De Almeida, M., Silva, E., De Andrade, V., Guimarães Leite. T. & Martins, M.J.A. (2011). Avaliação da integridade de membrana emespermatozóide bovino criopreservado para prever o índice de preñez.

- Duracka, M., Belic, L., Tokarova, K., Ziarovska, J., Kacaniova, M., Lukac, N. & Tvrda, E. (2021). Bacterial communities in bovine ejaculates and their impact on the semen quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 67: 6, 438-449. <https://doi.org/10.1080/19396368.2021.1958028>
- Farrell, P.B., Presicce, G.A., Brockett, C.C., & Foote, R.H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49(4), 871-879. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00036-3)
- Fernández-Novo, A., Santos-López, S., Barrajon-Masa, C., Mozas, P., de Mercado, E., Cáceres, E., Garrafa, A., Gonzales-Martin, J.V., Pérez-Villalobos, N., Oliet, A., Astiz, S. & Pérez-Garnelo, S. S. (2021). Effects of extender type, storage time, and temperature on bull semen parameters. *Biology*, 10: 630. <https://doi.org/10.3390/biology10070630>
- Martínez, E., Vázquez, J.M., Matas, C., Roca, J., Coy, P. & Gadea, J. (1993). Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 40(3), 547-557. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(93\)90408-w](https://doi.org/10.1016/0093-691x(93)90408-w)
- Panhwar, M.I., Kaka, A., Memon, A.A., Channo, A. & Koladri, H.A. (2024). *In vitro* impacts of Triladyl® extender on semen quality parameters of Tharparkar bull. *Pure Appl. Biol.*, 13(2): 134-140. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2024.130014>
- Peláez, J., Breininger, E., Alegre, B., Peña, F.J. & Domínguez, J.C (2006). In vitro evaluation of the quality and fertilizing capacity of boar semen frozen in 0.25 ml straws. *Reprod Domest Anim.* 41(2):153-61.
- Pernas, S., Fernández-Novo, A., Barrajon-Masa, C., Mozas, P., Pérez-Villalobos, N., Martín-Maldonado, B., Oliet, A., Astiz, S. & Pérez-Garnelo, S. S. (2023). Bull semen obtained on beef farms by electroejaculation: Sperm quality in the first two hours of storing with different extenders and holding temperatures. *Animals*, 13, 1561. <https://doi.org/10.3390/ani13091561>
- Prihantoko, K.D., Yuliasuti, F., Haniarti, H., Kusumanwati, A., Widayati, D.T. & Budiyanto, A. (2020). The effect of genistein on the plasma membrane integrity of frozen Ongole grade bull semen based on skim milk-soy lecithin extender. *10 Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 465, 012054. Doi: 10.1088/1755-1315/465/1/012054
- Rodríguez-Martínez H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 38(4), 312-318. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x>
- Sukirman, I., Sukmawati, E., Rasad, S.D. & Solihati, N. (2019). The influence of breed and type of extender on the quality of bull semen. *Animal Production*, 21(2): 64-70. [641_2997_1-PB.pdf](https://doi.org/10.1080/00036819.2019.1641297). Accredited by Kemenristek Dikti No 32a/E/KPT/2017. ISSN 1411-2027
- Talini, R., Kozicki, L.E., Gaievski, F.R., Polo, G., Lima, L.G.B., Santiago, J., Segui, M.S., Weiss, R.R. & Galan, T.G.B. (2019). Bovine semen thermoresistance tests and their correlation with pregnancy rates after fixed-time artificial insemination. *Arq. Bras. Vet. Zootec*, 71 (6): 2085-2092.
- Xu, X., Pommier, S., Arbov, T., Hutchings, B., Sotto, W. & Foxcroft, G.R. (1998). In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *Journal of animal science*, 76(12), 3079-3089. <https://doi.org/10.2527/1998.76123079x>