



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,  
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
ZOOTECNISTA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA  
CAPACIDAD FECUNDANTE EN LA PRODUCCIÓN DE  
EMBRIONES *in vitro* DE DOS BOVINOS  
HOMOCIGOTOS DE LA RAZA ABERDEEN ANGUS EN  
LA REGIÓN AMAZONAS, 2019**

**Autor:**

**Bach. Miguel Angel Arista Ruiz**

**Asesor:**

**M.Cs. Nilton Luis Murga Valderrama**

**CHACHAPOYAS – PERU**

**2019**



**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO  
RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA,  
AGRONEGOCIOS Y BIOTECNOLOGÍA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**DETERMINACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA  
CAPACIDAD FECUNDANTE EN LA PRODUCCIÓN DE  
EMBRIONES *in vitro* DE DOS BOVINOS  
HOMOCIGOTOS DE LA RAZA ABERDEEN ANGUS EN  
LA REGIÓN AMAZONAS, 2019**

**Autor: Bach. Miguel Angel Arista Ruiz**

**Asesor: M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2019**

### **Dedicatoria**

A Dios por ser nuestro creador, amparo, fortaleza y la luz que nos guía día a día. A mi querida madre María Mercedes Arista Ruiz, a mi incondicional hermana Wilmarita Arista por inculcarme los valores y brindarme su apoyo incondicional para poder lograr esta meta. Finalmente dedico este trabajo a todos mis amigos y compañeros que siempre estuvieron apoyándome.

*Miguel Angel Arista Ruiz.*

### **Agradecimiento**

A Dios por regalarme la vida, a mi familia por creer en mí y en mi perseverancia. A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas por ser la sede de todos estos conocimientos adquiridos. Al Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología (IGBI) y; al Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético por las instalaciones, materiales y equipos facilitados. Al M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama por ser el asesor, a la M.Sc. Gleni Tatiana Segura Portocarrero por todo el apoyo brindado para la realización de esta Tesis. Finalmente quiero agradecer a los docentes de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología por sus conocimientos y experiencias compartidas en mi formación profesional.

***Miguel Angel Arista Ruiz.***

**Autoridades de la UNTRM**  
**Ley de creación N° 27347**

**Dr. Policarpio Chauca Valqui**  
**Rector**

**Dr. Miguel Ángel Barrena Gurbillón**  
**Vicerrector Académico**

**Dra. Flor Teresa García Huamán**  
**Vicerrectora de Investigación**

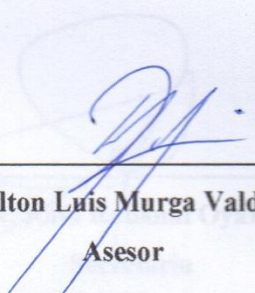
**M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama**  
**Decano de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología**



### Visto Bueno del Asesor de Tesis

Yo, Nilton Luis Murga Valderrama, identificado con Documento Nacional de Identidad N° 33430926, docente a tiempo completo de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista, hago constar que he asesorado el Proyecto de Tesis titulado: **“Determinación y Comparación de la Capacidad Fecundante en la Producción de Embriones *in vitro* de Dos Bovinos Homocigotos de la Raza Aberdeen Angus en la Región Amazonas, 2019”** presentado por el Bachiller Miguel Angel Arista Ruiz; egresado de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la UNTRM, dando el Visto Bueno a la presente Tesis.

Para lo cual firmo en conformidad.



---

M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama  
Asesor



---

M.Sc. Wicberto Alvarado Chequi  
Vocal

**Jurado Evaluador**

**Resolución de Decanato N° 269-2018-UNTRM-VRAC/FIZAB**

**DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO DE TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL**

Yo, Miguel Ángel Maraví Carmen

identificado con CNI N° 74205154

Intendente de Investigación

de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de

**M.Sc. César Augusto Maraví Carmen**

**Presidente**

DECLARO BAJO JURAMENTO QUE:

1. Soy autor de la Tesis titulada: El rol de la familia en la formación de la personalidad del niño en la familia nuclear que presento para obtener el Título Profesional de Psicólogo.
2. La Tesis no ha sido copiada ni reproducida en ningún idioma ni en ningún formato, ni ha sido presentada para obtener algún grado académico previo o título profesional.
3. La Tesis presentada no es una copia de ninguna otra tesis o trabajo de investigación.
4. La Tesis presentada no ha sido previamente presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. La información presentada es veraz y no ha sido falsificada, ni duplicada, ni copiada.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis para obtener el Título Profesional, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas personales que pudieran derivarse de la declaración o las que surrieren en caso de incumplimiento de la Tesis.

**M.Sc. Wigoberto Alvarado Chuqui**

**Vocal**





**ANEXO 3-N**

**ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL**

En la ciudad de Chachapoyas, el día 13 de noviembre del año 2019, siendo las 16 horas, el aspirante Pach. Miquelangel Arto Ruiz

defiende en sesión pública la Tesis titulada: Determinación y comparación de la capacidad pecuaria en la producción de cerdos in vitro de dos bovinos híbridos de la raza Aberdeen Angus en la Región Amazonas 2019

para obtener el Título Profesional de Ingeniero zootecnista a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente : Cesar Augusto Maravi Carmen

Secretario : Raul Rueda Oyance

Vocal : Wiroberto Alvarado Chuqui



Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (  ) Desaprobado (  )

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 17:30 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

[Signature]  
SECRETARIO

[Signature]  
VOCAL

[Signature]  
PRESIDENTE

OBSERVACIONES: .....





**ANEXO 3-K**

**DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO DE TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL**

Yo Miguel Angel Arista Ruiz  
identificado con DNI N° 76968952 Estudiante( )/Egresado (X) de la Escuela Profesional de  
Ingeniería Zootecnista de la Facultad de:  
Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología  
de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

**DECLARO BAJO JURAMENTO QUE:**

1. Soy autor de la Tesis titulada: Determinación y Comparación de la Capacidad  
Fecundante en la Producción de Embriones in vitro de Dos Bovinos  
Homocigotas de la Raza Aberdeen Angus en la Región Amazonas, 2019

que presento para  
obtener el Título Profesional de: Ingeniero Zootecnista

2. La Tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, y para su realización se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.
3. La Tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.
4. La Tesis presentada no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
5. La información presentada es real y no ha sido falsificada, ni duplicada, ni copiada.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la Tesis para obtener el Título Profesional, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Asimismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la Tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que la Tesis para obtener el Título Profesional haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción se deriven.

Chachapoyas, 13 de noviembre de 2019

[Firma]  
Firma del(a) tesista

## Índice General

Pág.

Dedicatoria .....	iii
Agradecimiento .....	iv
Autoridades de la UNTRM .....	v
Visto Bueno del Asesor de Tesis .....	vi
Jurado Evaluador .....	vii
Declaración Jurada de No Plagio de Tesis Para Obtener el Título Profesional ....	viii
Acta de Evaluación de Sustentación de Tesis Para Obtener el Título Profesional	viii
Índice General .....	ix
Índice de Tablas .....	xii
Índice de Figuras.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xv
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>II. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
2.1. Lugar de estudio .....	19
2.2. Materiales.....	19
2.3. Diseño de la investigación.....	19
2.4. Evaluación de motilidad individual o progresiva post descongelación .....	20
2.5. Selección de los animales donantes de óvulos .....	20
2.6. Obtención de los ovarios y aspiración del complejo ovocito-cúmulos (COCs) .....	20
2.7. Maduración <i>in vitro</i> de los complejos ovocito-cúmulos (COCs).....	21
2.8. Fertilización <i>in vitro</i> de los complejos ovocito-cúmulos (COCs).....	21
2.9. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones .....	22
<b>III. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Motilidad individual post descongelación .....	23
3.2. Capacidad fecundante <i>in vitro</i> .....	23
3.3. Producción total de embriones.....	24
3.3.1. Producción de blastocistos iniciales .....	24
3.3.2. Producción de blastocistos .....	25
3.3.3. Producción de blastocistos expandidos.....	25
<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>27</b>

<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	30
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31
<b>ANEXOS</b> .....	36
<b>Anexo 1: Resultados generales de la investigación</b> .....	36
<b>Anexo 2: Resultados estadísticos</b> .....	38
<b>Anexo 3: Panel fotográfico</b> .....	41



## Índice de Tablas

	Pág.
<b>Tabla 1: Materiales y equipos usados para la producción de embriones <i>in vitro</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>Tabla 2: Resultados de significancia para todas las variables.....</b>	<b>26</b>
<b>Tabla 3: Resultados de las pruebas <i>in vitro</i> del toro JTRM.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 4: Resultados de las pruebas <i>in vitro</i> del toro VTRM.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabla 5: Pruebas de normalidad.....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 6: Estadísticas de grupo.....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 7: Prueba de muestras independientes.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 8: Prueba de Mann-Whitney.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 9: Estadísticos de prueba.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 10: Significancia.....</b>	<b>40</b>

## Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Evaluación de motilidad individual post gradiente de selección.....	23
Figura 2. Evaluación de la capacidad fecundante.....	23
Figura 3. Evaluación de la producción total de embriones.....	24
Figura 4. Evaluación de producción de blastocistos iniciales.....	25
Figura 5. Evaluación de producción de blastocistos.....	25
Figura 6. Evaluación de producción de blastocistos expandidos.....	26
Figura 7. Recolección de ovarios de camal.....	41
Figura 8. Transporte de ovarios al laboratorio.....	41
Figura 9. Aspiración de los COCs.....	41
Figura 10. Búsqueda, selección y categorización de óvulos.....	41
Figura 11. Maduración <i>in vitro</i> y CIV.....	42
Figura 12. Descongelamiento de las pajillas.....	42
Figura 13. Evaluación seminal.....	42
Figura 14. Fertilización <i>in vitro</i> .....	42
Figura 15. Óvulos maduros.....	43
Figura 16. Óvulos fecundados.....	43
Figura 17. Blastocisto inicial.....	43
Figura 18. Blastocisto.....	43
Figura 19. Blastocisto expandido.....	43

## Resumen

La epigenética estudia las variaciones hereditarias que ocurren sin que cambie la secuencia del ADN. El objetivo de la investigación fue determinar y comparar la capacidad fecundante en la producción de embriones *in vitro* de dos bovinos homocigotos de la raza Aberdeen Angus. Se utilizó ovarios recolectados del camal municipal de Chachapoyas, de vacas Brown Swiss cruzadas, clínicamente sanas y con edades entre los 3 y 5 años, determinado por sus incisivos. Los ovocitos se aspiraron con una jeringa de 10 ml y una aguja hipodérmica 18 G, para ser madurados por un espacio de 24 horas en promedio. Ya madurados se fecundaron con el semen de los toros JTRM y VTRM por 18 horas. Una vez fecundados se cultivaron por 7 días en gotas de 90  $\mu$ l de medio fluido oviductual sintético (SOF) cubiertos con aceite mineral. Se evaluó la motilidad post descongelación, no encontrando diferencia significativa entre los dos toros. A los 3 días de cultivo se evaluó el porcentaje de fertilidad *in vitro*, siendo superior el toro JTRM 56.48% frente al toro VTRM 40.74% ( $p < 0.05$ ). Finalizado los 7 días de cultivo se evaluó la producción total de embriones (blastocistos iniciales (Bi), blastocistos (Bl) y blastocistos expandidos (Bx)), presentando mayor porcentaje de embriones a favor del toro JTRM 27.86% y VTRM 23.86% ( $p < 0.05$ ). Finalmente los toros no difieren en motilidad individual pero si en la producción de embriones ( $p < 0.05$ ).

**Palabras clave:** fertilidad *in vitro*, embriones, espermatozoides.



## Abstract

Epigenetics studies inherited variations that occur without changing the DNA sequence. The objective of the research was to determine and compare the fertilizing capacity in the production of *in vitro* embryos of two homozygous cattle of the Aberdeen Angus breed. Ovaries collected from the municipal Chachapoyas road, from Brown Swiss cows, clinically healthy and aged between 3 and 5 years, determined by their incisors, were used. The oocytes were aspirated with a 10 ml syringe and an 18 G hypodermic needle, to be matured for a period of 24 hours on average. Already matured they fertilized with the semen of the JTRM and VTRM bulls for 18 hours. Once fertilized, they were grown for 7 days in drops of 90 µl of synthetic oviductual fluid medium (SOF) covered with mineral oil. Post defrosting motility was evaluated, finding no significant difference between the two bulls. After 3 days of cultivation, the percentage of *in vitro* fertility was evaluated, the JTRM bull being 56.48% higher than the VTRM bull 40.74% ( $p < 0.05$ ). After 7 days of culture, the total production of embryos (initial blastocysts (Bi), blastocysts (Bl) and expanded blastocysts (Bx)) was evaluated, presenting a higher percentage of embryos in favor of the JTRM 27.86% and VTRM 23.86% ( $p < 0.05$ ). Finally, bulls do not differ in individual motility but in embryo production ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** *in vitro* fertility, embryos, sperm.

## I. INTRODUCCIÓN

En las ciencias médicas los gemelos homocigotos constituyen un grupo idóneo para abordar el estudio de las variabilidades epigenéticas, etc. En este tipo de padecimientos suelen observarse similitudes entre parientes, en especial si se trata de gemelos homocigotos. Sin embargo, aún en este tipo de hermanos se detectan diferencias importantes. Parámetros como los grados de concordancia y porcentajes de heredabilidad han puesto de manifiesto que un gemelo monocigótico puede presentar trastornos hereditarios que su co-gemelo nunca tendrá. La epigenética es el estudio de los cambios en la función de los genes que no afectan la secuencia del ADN, sino por modificaciones que tienen lugar principalmente en las citosinas de éste y en las histonas de la cromatina. Se ha determinado que las modificaciones epigenéticas son mucho más frecuentes que aquellas que modifican la secuencia del ADN, por lo que constituyen uno de los fundamentos de la diversidad biológica; muestran la manera en que el ambiente puede modular la expresión genética y contribuyen así a nuestro fenotipo. (Gonzales, Díaz y Díaz-Anzaldúa, 2008)

(Brero, Leonhardt y Cardoso, 2006), mencionan que en el momento actual, se ha incrementado además el interés por esclarecer las razones por las que una misma información genómica puede ser regulada para producir distintos tipos celulares en un mismo individuo o distintas características aún en individuos genéticamente idénticos. Aunado a la secuencia nucleotídica unidimensional del ADN, se ha demostrado que hay un nivel epigenético que afecta la morfología y las funciones celulares, es decir, su fenotipo, al influir en la activación e inactivación de genes. Este nivel epigenético puede variar incluso entre gemelos idénticos. (p.22)

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es el principal objetivo en la producción de semen bovino. La búsqueda de un análisis seminal que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra cobra vital importancia en el contexto de la reproducción animal; sin embargo, este análisis integral es difícil de desarrollar debido a la complejidad inherente de las células espermáticas (Quintero, Mayorga y Cardona, 2017).

Antes de usar un toro en los programas de reproducción es recomendable conocer su fertilidad. En muchos casos no es suficiente que haya tenido algunas crías, es deseable conocer la fertilidad con un grado de exactitud, en especial cuando se usa en programas

de FIV, inseminación artificial y monta natural de un gran número de hembras (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000, p.329).

El análisis de semen clásico permite realizar una primera evaluación rápida de la calidad espermática, ayudando en la predicción del potencial de fertilidad, así como en la identificación de posibles causas de infertilidad. La prueba debe incluir unos factores que evalúan diversas funciones de la célula espermática. Aunque no hay un consenso sobre la eficacia de las diferentes pruebas utilizadas en cuanto a predicción de la fertilidad del macho. El espermograma sigue siendo un método muy utilizado que permite valorar la calidad de las muestras seminales correspondientes a diferentes especies. No obstante, en ocasiones, los resultados de los parámetros espermáticos del espermograma clásico pueden no ser suficientes para determinar con exactitud la capacidad fecundante de un eyaculado (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000, p.330).

La predicción de la capacidad fecundante del espermatozoide es técnica y económicamente muy importante, en especial cuando se trabaja con reproductores que están en centros de inseminación. Los investigadores en el mundo han desarrollado varias pruebas relacionadas con la calidad de semen y su morfología (Barth, 1992), motilidad espermática (Kjaestad et al., 1993; Holt et al., 1997), componentes bioquímicos del semen (Hirao, 1975), presencia de cromosoma intacto (Correa et al., 1997), integridad de membrana plasmática (Perez et al., 1997), concentración de espermatozoides seleccionados por swim up (Zhang et al., 1998), reacción acrosómica (Januskauskas et al., 2000), etc.

Además de estas técnicas antes descritas, también se encuentra la evaluación de semen *in vitro*, mediante esta técnica se puede evaluar la capacidad fecundante tanto de semen fresco como de semen descongelado, aunque son pruebas de alta complejidad, ya que existen diferentes atributos necesarios para que un espermatozoide pueda fecundar un óvulo (Graham y Mocé, 2005, p.495).

Guillan et al., (2008), han demostrado que existe correlación confiable y repetible entre distintas pruebas *in vitro* con la fertilidad; aunque hasta la fecha no se puede traducir el resultado arrojado por el espermograma en porcentaje de preñez de una determinada inseminación o de un toro en particular, por lo tanto, para lograr algún progreso en este sentido se debe abordar la calidad seminal desde diferentes puntos de vista con el fin de



obtener una comprensión de los posibles factores derivados del análisis seminal que impactan en la tasas de preñez.

La producción de embriones *in vitro* se ha desarrollado y utilizado para la producción de crías de alto valor genético de diferentes especies (Palmer et al., 1991). Esta técnica implica la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV), fecundación *in vitro* de ovocitos (FIV) y el cultivo *in vitro* de ovocitos fecundados (CIV) hasta el estadio de blastocisto. A través de los años, muchos estudios, realizados principalmente en bovinos, han demostrado que el donante del semen influye en gran medida el resultado fecundación y cultivo de embriones (Shi et al., 1990; Shamsuddin y Larsson, 1993). A los ensayos de fertilidad *in vitro* se denominan prueba de penetración espermática (Hay et al., 1997; Gadea et al., 1998), en la cual los espermatozoides demuestran su habilidad para penetrar la zona pelúcida, realizar una fecundación y completar su desarrollo.

El mayor éxito del procedimiento de fecundación *in vitro* se demuestra al producir individuos vivos, utilizando tanto ovocitos madurados *in vivo* o *in vitro*, aunque la eficiencia de estos procesos de FIV disminuye respecto a la fecundación natural, de igual modo que cuando se utilizan ovocitos madurados *in vivo* frente a los madurados *in vitro* (Lorenzo et al., 1994).

Por ello, en los últimos años la evaluación de la calidad y la capacidad fecundante del espermatozoide bovino ha incrementado su importancia en la industria de la inseminación artificial y en los programas de selección de reproductores y mejoramiento genético, no solo porque involucra directamente la fertilidad de los toros, sino también por el alcance que puede tener esta búsqueda en la fertilidad de su descendencia (Gonzales y Campos, 2013).

La evaluación de motilidad espermática es comúnmente utilizado por laboratorios de análisis de semen, debido a su simplicidad, rapidez y bajo costo (Gadea et al., 1998; 2004), sin embargo, la correlación con la fertilidad es muy variable, baja y en muchos casos contradictoria (Xu et al., 1998 y Tardif et al., 1999). La medida de motilidad espermática es subjetiva debido a que depende individualmente del observador y la precisión de la estimación de la motilidad es muy importante, siendo de alta correlación con la fertilidad, si se usa como variable el promedio de la estimación de diferentes técnicos (Foote, R. 2003).

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Lugar de estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético del Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología (IGBI), de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM).

### 2.2. Materiales

Tabla 1: *Materiales y equipos usados para la producción de embriones in vitro*

<b>Materiales</b>	<b>Material biológico y reactivos</b>	<b>Equipos</b>
Termo de transporte de ovarios	Ovarios recolectados de camal	Baño maría
Tijera	Solución salina al 0.9%	Estereoscopio
Termómetro	Medio de manipulación	Microscopio
Set de Tips de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl	Medio de maduración	Cabina de bioseguridad
Guantes quirúrgicos		
Set de Micropipetas de 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl	Medio de fecundación	Incubadora de CO <sub>2</sub> estacionaria
Papel toalla		
Botas de jebe	Medio de cultivo	Platina térmica
Overol	Semen bovino	Centrífuga
Vaso bicker	Percoll al 45%	Balón de gas CO <sub>2</sub>
Jeringa de 10 ml	Percoll al 90%	
Aguja hipodérmica 18 G	Alcohol al 70%	
Tubos falcon de 15 ml	Aceite mineral	
Pipetas Pasteur	Agua ultrapura	
Placas de 35, 70 y 100 mm	Agua destilada	
Tubos eppendorf		
Portaobjetos y cubreobjetos		

### 2.3. Diseño de la investigación

Se utilizó el diseño pre experimental con post pruebas en dos grupos y con muestras diferentes. Se realizaron en total 24 repeticiones por cada toro.

Torres (2013), menciona que la investigación pre experimental es aquella donde el investigador ejerce un mínimo, poco o nulo nivel de control sobre las variables y no hay asignación aleatoria.

#### **2.4. Evaluación de motilidad individual o progresiva post descongelación**

Se descongeló la pajillas de semen de los toros JTRM y VTRM a una temperatura de 38.5°C por 60 segundos, a continuación se colocó una gota (10 µl) de semen sobre un portaobjetos a 37°C y se colocó sobre esta un cubreobjetos, también a la misma temperatura. Se observó al microscopio, se valoró visualizando el porcentaje de espermatozoides que se mueven en forma rectilínea progresiva, siendo éstos los que atraviesan el campo de observación. Los espermatozoides que giran en círculo o avanzan en forma oscilatoria se consideró que tienen movimientos anormales.

#### **2.5. Selección de los animales donantes de óvulos**

Las vacas a donar los ovarios se seleccionaron del camal municipal de la ciudad de Chachapoyas, previo al beneficiado, se realizó una evaluación *ante mortem* como el estado sanitario, edad del animal por el número de sus incisivos, seleccionando a los que se encuentren entre 3 y 5 años indicativo que ya se encuentren en edad reproductiva y que por lo menos hayan tenido un parto (4 - 8 dientes) (Casas et al., 2001).

#### **2.6. Obtención de los ovarios y aspiración del complejo ovocito-cúmulos (COCs)**

Para la recolección de los ovarios se tuvo en cuenta que se encuentren todas las estructuras ováricas como folículo primario, folículo secundario, cuerpo hemorrágico, cuerpo lúteo, etc. que son indicativos que son ovarios funcionales y que los animales se encontraban reproductiva y clínicamente sanos. Estos se colocaron en un termo conteniendo solución salina al 0.9%, suplementado con antibiótico y temperado a 38°C para luego ser transportados al laboratorio. Los óvulos se recuperaron de los folículos ováricos entre los 2 mm y 7 mm a través de la técnica de aspiración folicular de ovarios de matadero mediante una jeringa y una aguja hipodérmica de 10 ml y 18 G respectivamente, posteriormente los COCs aspirados se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml de base cónica, temperado a 37 °C para esperar de 10 a 15 minutos que los óvulos descendan a la base del tubo, a continuación se lavaron en medio de manipulación TCM HEPES + 10% SFB y finalmente se realizó la búsqueda y categorización en un estereoscopio mediante la observación.

Los COCs fueron evaluados por su morfología y clasificados dentro de 4 categorías (De Loos et al., 1992 y Sato et al., 1990): (A) completamente rodeados por  $\geq 3$  capas células del cúmulus con citoplasma homogéneo, (B) ovocitos rodeados por 2 capas de células del cúmulus, (C) ovocitos desnudados y (D) ovocitos rodeado por fibrina,

con aspecto de tela de araña. Los COCs se clasificaron como viables (calidad A y B) y no viables (calidad C y D), para los procesos de maduración y fecundación *in vitro*.

### **2.7. Maduración *in vitro* de los complejos ovocito-cúmulos (COCs)**

Después de la recuperación y clasificación, los COCs de calidad A y B (viables) fueron lavados dos veces en medio de manipulación. Se colocaron 25 óvulos por microgota de 90 µl con medio de maduración, cubiertas con 4 ml de aceite mineral, en placas FIV de 35 mm, que previamente fue equilibrada como mínimo por 2 horas en condiciones de 5% CO<sub>2</sub>, 38,5 °C y humedad sobre 90% en la incubadora.

Los grupos de COCs se maduraron por un promedio de 24 horas en una atmósfera humidificada con 5% CO<sub>2</sub> a 38.5 °C, en medio de maduración TCM-199 suplementado con 2 µl/ml de piruvato de sodio, 1 µl/ml de gentamicina, 5 µl/ml de hormona folículo estimulante (FSH), 5 µl/ml de hormona luteinizante (LH), 6 µl/ml de glutamina, 1 µl/ml factor de crecimiento epidermal (EGF), 1 µl/ml de estradiol y 10% SFB.

### **2.8. Fertilización *in vitro* de los complejos ovocito-cúmulos (COCs)**

Después de las 24 horas de maduración en promedio, los ovocitos fueron retirados del medio de maduración y lavados en medio de fecundación, seguidamente fueron colocados en microgotas de 90 µl de medio de fecundación en placas FIV 35 mm, cubiertos con aceite mineral, previamente incubados a 38.5°C y 5% CO<sub>2</sub> por 2 horas, posteriormente se adicionó 10 µl de espermatozoide por microgota, seleccionados por el método de Percoll y diluido en igual proporción con medio de fecundación.

Para la fertilización se usó semen criopreservado de dos bovinos gemelos homocigotos de raza Aberdeen Angus; JTRM y VRTM. Los espermatozoides se seleccionaron por el método de Percoll, para ello se realizó un centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos, se retiró el pellet, a continuación se homogenizó este con medio de fecundación y se centrifugó a 1700 rpm por 3 minutos para un lavado del semen, posteriormente se retiró 30 µl de pellet, se homogenizó con la misma cantidad de medio de fecundación, y se adicionó separadamente a los ovocitos maduros en las placas con medio de fertilización TALP-FIV (Vajta *et al.*, 2000), suplementado con 10 µl/ml de piruvato de sodio, 1 µl/ml de gentamicina, 10 µl/ml de heparina y 0.003 gr/ml de BSA-FAF. Los COCs madurados y los espermatozoides seleccionados se incubaron por 18 horas en una atmósfera humidificada a 38.5°C con 5% CO<sub>2</sub>.

## **2.9.Cultivo *in vitro* de embriones**

Los embriones resultantes de la FIV, aproximadamente 18 horas post inseminación, se desnudaron los ovocitos casi completamente por pipeteo en las mismas gotas de medio de fecundación y se lavaron en medio de cultivo antes de transferirlos a microgotas de medio de cultivo CIV de 90  $\mu$ l, cubiertas de 4 ml de aceite mineral, donde los embriones continúan su división celular a 8, 16 y 32 células hasta llegar a mórulas y blastocistos (Hernández, 2005). Las placas de cultivo de 35 mm fueron incubadas a 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, y 90% de humedad. Al día 3 de cultivo se realizó la primera renovación del 50% de medio de cultivo y la evaluación de la capacidad fecundante, así mismo se retiró el restante de las células del cúmulus. El día 5 del cultivo se realizó la segunda renovación del 50% de medio de cultivo.

Posteriormente para el día 7 de cultivo se obtuvieron los embriones en el estadio de blastocisto inicial, blastocisto propiamente dicho y blastocisto expandido.



### III. RESULTADOS

#### 3.1. Motilidad individual post descongelación

La figura 1 muestra los porcentajes de motilidad individual progresiva después de haber descongelado al semen por 60 segundos a una temperatura de 38.5 °C. Los valores de 28.33%<sup>a</sup> y 25.00%<sup>a</sup> corresponden a los porcentajes promedios del semen de los toros JTRM y VTRM respectivamente, sin presentar diferencia estadística.

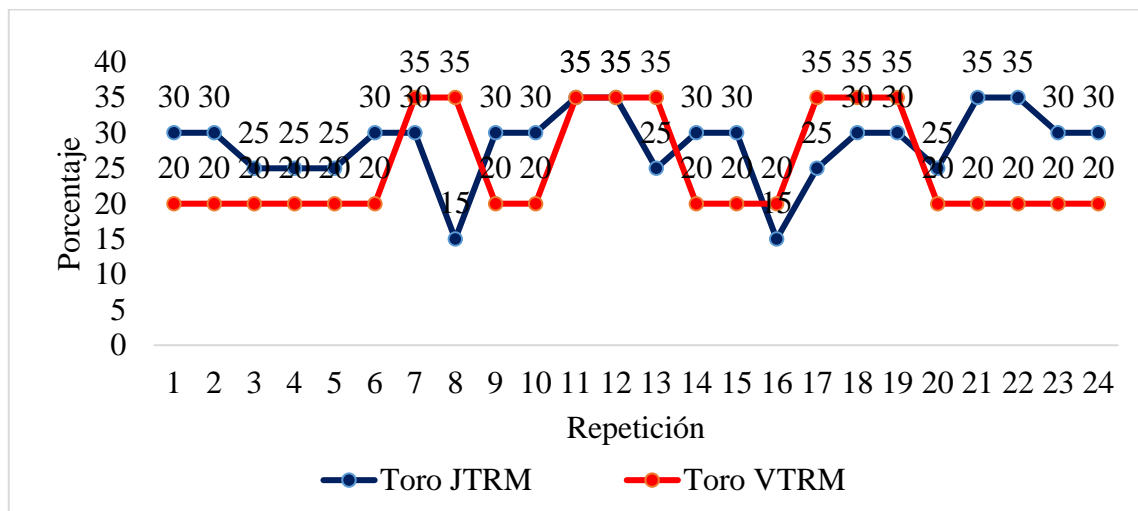


Figura 1. Evaluación de motilidad individual post descongelación.

#### 3.2. Capacidad fecundante *in vitro*

Este es el principal objetivo evaluado en la presente investigación, el porcentaje promedio de fertilidad del toro JTRM es de 56.48%<sup>a</sup>, mientras que del toro VTRM el promedio es de 40.74%<sup>b</sup>, se evaluó 48 horas post cultivo *in vitro* y contando los cigotos que presentaban 3 o más células. Para este objetivo la diferencia porcentual es de 15.74% y encontrando diferencia estadística.

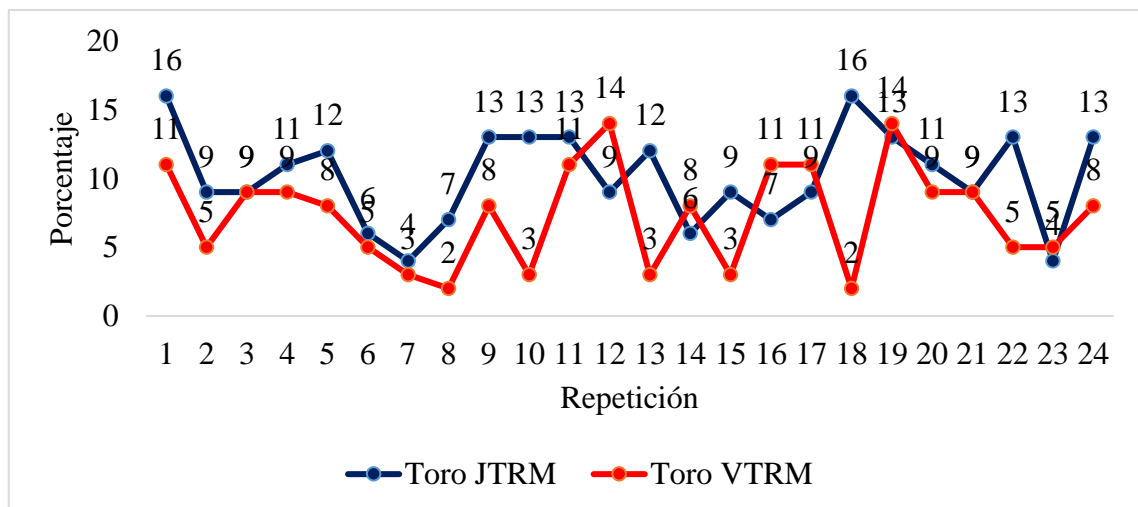


Figura 2. Evaluación de la capacidad fecundante.

### 3.3. Producción total de embriones

La producción total de embriones es la sumatoria de los embriones que llegaron hasta los estadios de blastocisto inicial, blastocisto y blastocisto expandido, la figura 3 nos muestra el número de embriones por repetición de los dos toros. El porcentaje total de embriones para el toro JTRM fue de 27.86%<sup>a</sup>, mientras que para el toro VTRM fue de 23.86%<sup>b</sup>, encontrando una variación porcentual del 4% y significando esta diferencia estadística. Todas las variables antes evaluadas fueron analizadas estadísticamente a un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ )

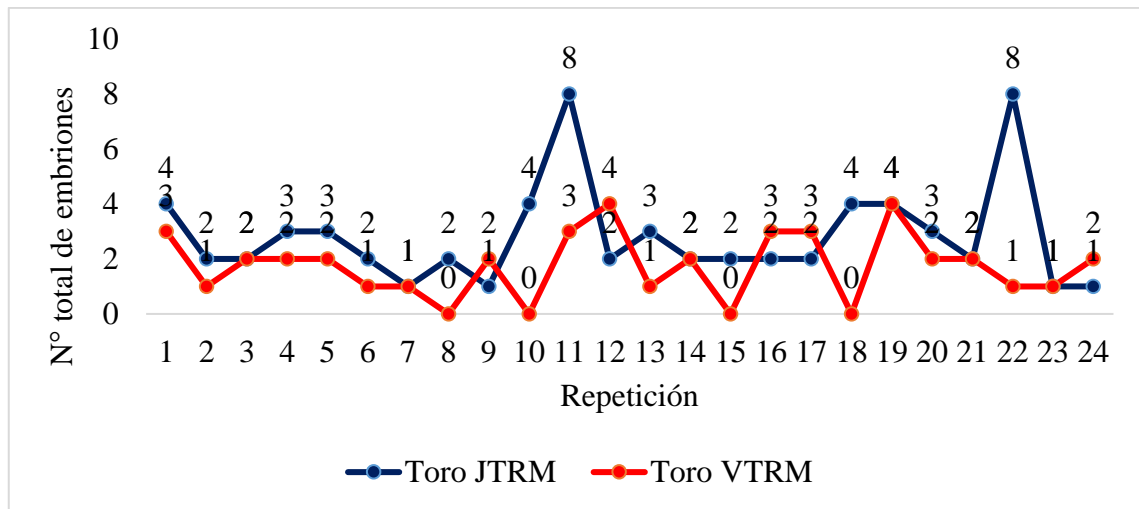


Figura 3. Evaluación de la producción total de embriones

#### 3.3.1. Producción de blastocistos iniciales

La figura 4 muestra los números de embriones por repetición que llegaron hasta el estadio de blastocistos iniciales después de la fecundación con promedios porcentuales de 21.31%<sup>a</sup> para el toro JTRM y 14.77%<sup>b</sup> para el toro VTRM. La diferencia porcentual para esta variable es 6.54% encontrando diferencia estadística significativa para esta variable.

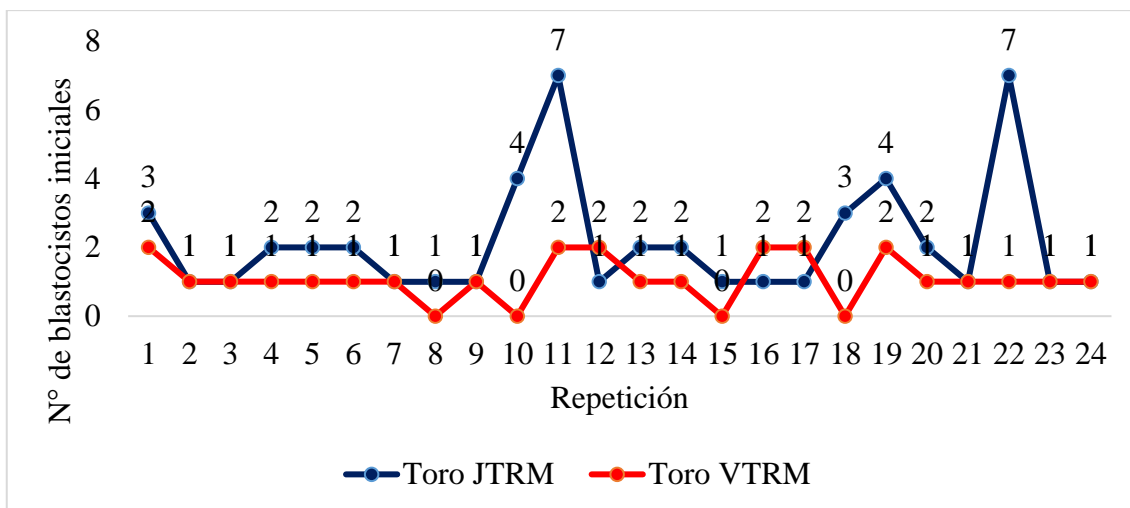


Figura 4. Evaluación de producción de blastocistos iniciales.

### 3.3.2. Producción de blastocistos

El cultivo *in vitro* embrionario trata de simular, de manera artificial en la incubadora las condiciones en las que se desarrolla un embrión preimplantacional desde el estadio de cigoto hasta el estadio de blastocisto (Báez et al., 2010).

La media en porcentaje de blastocistos que lograron llegar hasta este estadio es de 5.73%<sup>a</sup> y 7.95%<sup>a</sup> para los toros JTRM y VTRM respectivamente detallada en la figura 5 sin encontrar diferencia estadística para esta variable.

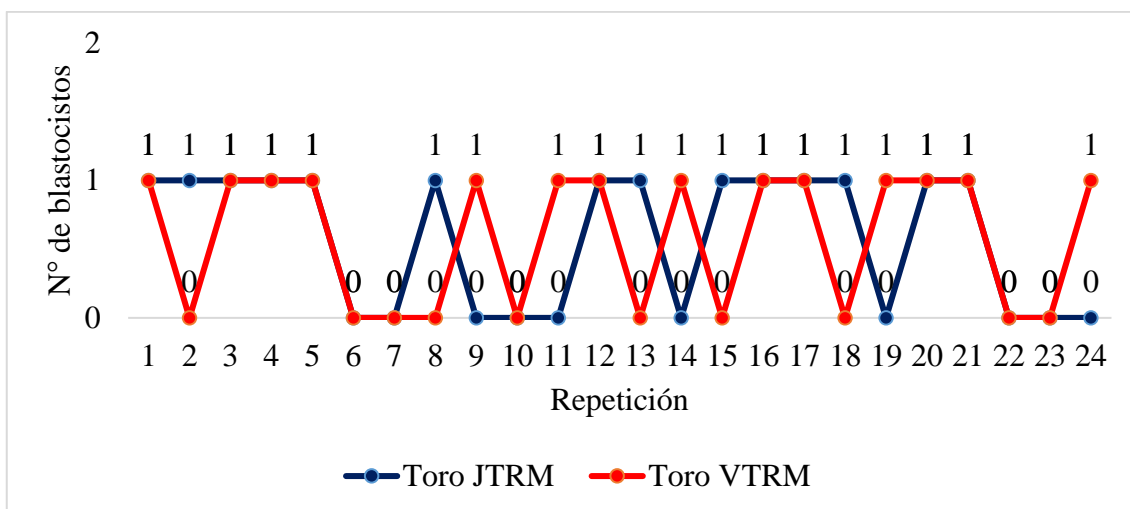


Figura 5. Evaluación de producción de blastocistos.

### 3.3.3. Producción de blastocistos expandidos

El valor promedio de la producción de blastocistos expandidos que arrojaron las 24 repeticiones fue de 0.82%<sup>a</sup> para el toro JTRM, mientras que para el toro VTRM la media fue de 1.13%<sup>a</sup>, encontrando una diferencia porcentual del 0.31% y esto a la vez no demuestra una diferencia significativa.

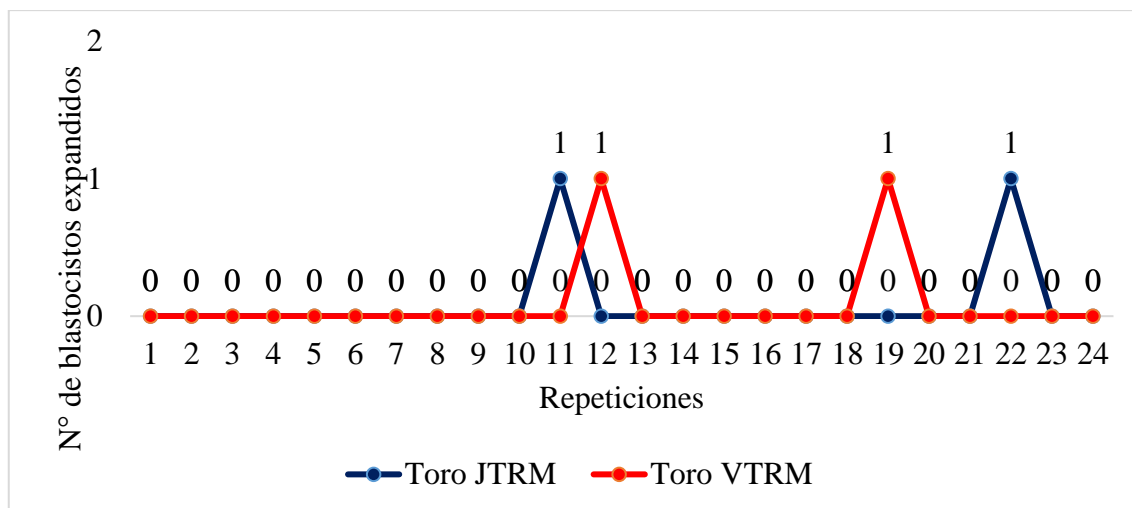


Figura 6. Evaluación de producción de blastocistos expandidos

La tabla 2 muestra la media para cada variable estudiada; motilidad post descongelación, capacidad fecundante, porcentaje de embriones en los estadios de blastocistos iniciales, blastocistos y blastocistos expandidos de las pruebas *in vitro* de los toros JTRM y VTRM realizados en el laboratorio con su respectiva significancia.

Tabla 2: Resultados de significancia para todas las variables

Nombre del toro	Motilidad Post Descongelación	Óvulos Fecundados	Bi	Bl	Bx	TE
	%					
JTRM	28.33	56.48 <sup>a</sup>	21.31 <sup>a</sup>	5.73	0.82	27.86 <sup>a</sup>
VTRM	25.00	40.74 <sup>b</sup>	14.77 <sup>b</sup>	7.95	1.13	23.86 <sup>b</sup>

Bi: blastocistos iniciales. Bl: blastocistos. Bx: blastocistos expandidos. TE: total de embriones

Valores promedio  $\pm$  desviación estándar

<sup>a,b</sup> letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativa

#### IV. DISCUSIÓN

Este trabajo busca encontrar o no, variabilidad estadística significativa de la capacidad fecundante o el porcentaje de fertilidad *in vitro* y la producción de embriones con el semen de dos bovinos clonados por bipartición embrionaria.

Tello (2017) reporta que la motilidad individual para toros de la raza Aberdeen Angus en promedio es 32.91%. En esta investigación los promedios de motilidad individual o progresiva post descongelación son de 28.33% y 25.00% para los toros JTRM y VTRM respectivamente, valores que se aproximan a los encontrados por el mencionado autor. Pero este es menor a los encontrados por Rubio et al., (2007) en su evaluación de semen de toros adultos (5-7 años), quienes reportan una motilidad progresiva de  $62,91 \pm 1,40$  %, por lo cual, la edad, podría ser un indicador de la baja motilidad individual encontrada en esta investigación debido a que los toros que se emplearon estaban en una edad de 3.5 años, sin embargo estudios realizados demuestran que a una edad adulta esta motilidad podría incrementarse, (Decuadro y Hansen 2000). Un factor importante en la producción seminal de un toro es el sistema de manejo y crianza en el que se encuentra, esto es corroborado por Torrado et al., (2016) donde evaluaron la aptitud reproductiva potencial del toro en sistemas extensivos y reportan una motilidad progresiva de  $57,26 \pm 16,03$  %. Cabe mencionar también que los toros de esta investigación fueron criados y manejados en un sistema extensivo. Sin embargo los resultados no son similares debido a que existen otros factores que también influyen en la calidad seminal de los sementales (factores ambientales, factores sanitarios, factores genéticos, etc.) y debido a que cada ejemplar así contenga similar o la misma información genética de otro ejemplar es capaz de expresar sus características reproductivas y otras, individualmente.

La producción de embriones *in vitro* en bovinos tiene 3 pasos esenciales. En el primer paso de maduración *in vitro* aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros y recuperado de los folículos (profase I) llegan a tener maduración nuclear (metafase II), de allí cerca del 80% son fecundados luego de la inseminación y desarrollan a dos células (Rizos et al., 2002). Similares resultados son encontrados por Fernández et al. (1999) donde la tasa de fecundación para la producción de embriones *in vitro* fue de 74% con el uso de semen de toros *Bos indicus* y *Bos taurus*. Esto es corroborado también por Medina et al., (2002) quienes encontraron una fertilidad *in vitro* de 77,3% y 78,5% para diferentes toros. Estos resultados difieren enormemente a los resultados obtenidos con el semen de



los gemelos homocigotos Aberdeen Angus, quienes tuvieron en promedio porcentajes de fertilidad *in vitro* de 56.48% el toro JTRM y 40.74% el toro VTRM, siendo esto un valor muy variable ya que la fertilidad de los toros es diferente al utilizar semen congelado tanto en campo como en la producción de embriones *in vitro* (Watanabe et al., 1998). Conjuntamente Puglisi et al., (2006) estudiando el comportamiento en la FIV de semen provenientes de dos toros diferentes, reportan una menor tasa de fertilidad en uno de ellos ya que cada animal es capaz de expresar sus características fenotípicas y reproductivas individualmente. Por otra parte Wilson et al., (2006) estudiaron el semen de diferentes toros en FIV no obteniendo diferencias en la tasa de fertilidad, pero si en la producción de embriones.

El mejor indicador de eficiencia en producción de embriones *in vitro* es la cantidad y calidad de blastocistos producidos al día 7 post fecundación (Lonergan et al., 2006). Según Rizos et al., (2002) solo el 30 a 40% de los ovocitos iniciales tienen la capacidad para llegar al estado de blastocistos. En esta investigación los porcentajes de producción embrionaria estuvieron por debajo de los promedios óptimos de producción (27.86% el toro JTRM y 23.86% el toro VTRM) lo cual podría deberse a los bajos resultados de motilidad individual que se obtuvieron de los toros antes mencionados en el estudio. Bonilla et al., (2018) también encontraron resultados de producción de embriones *in vitro* similares a los encontrados en esta investigación de 22.2% con semen de toros *Bos taurus*. Estos resultados también los presentan Medina et al., (2002) donde los valores de producción embrionaria fueron de 26,3% y 28,8% de dos toros diferentes, pero se contradicen a los resultados de la investigación de Palma et al., (2007) ellos encuentran un porcentaje de producción de blastocistos del 33,6%, Presicce et al., (2011) de 39.8% y Dayan, A. (2001) 36.2%. Sin embargo, Urrego et al., (2008) muestra una tasa inferior de embriones que los resultados encontrados en esta investigación que van desde un 18 a 20%.

## V. CONCLUSIONES

La evaluación de motilidad individual o progresiva post descongelación de los dos toros presenta porcentajes similares.

La fertilidad *in vitro* o capacidad fecundante fue mayor en un 15.74% a favor del toro JTRM.

La mayor producción total de embriones en los estadíos de blastocistos iniciales (Bi), blastocistos (Bl) y blastocistos expandidos (Bx) se obtuvo con el uso del semen del toro JTRM (27.86%).

Adicionalmente se puede concluir que la expresión genética de ambos toros, es decir su fenotipo, en la producción de embriones *in vitro*, difieren estadísticamente y, a pesar de tener el toro JTRM una ventaja frente al toro VTRM en la fertilidad y la producción de embriones no sería conveniente el uso del semen de estos toros para la producción de embriones FIV, debido a que no alcanzaron los valores promedio aceptables que van desde un 30% a un 40% de embriones del total de ovocitos iniciales que se maduran. Sin embargo existen otras biotecnologías para aprovechar la genética de estos animales.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Cuando se pretende realizar este tipo de investigaciones con animales genéticamente idénticos y para complementar y validar mejor este tipo de investigaciones, a futuro, se recomienda realizar el secuenciamiento genómico del ADN de los animales con el fin de determinar si existe o no diferencias en el ordenamiento del genoma de los animales; y cuanto influyen estos resultados en su fenotipo.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Báez, F.J.; Chávez, A.C.; Hernández, H.J.; Villamediana, P.C. (2010). Evaluación de la capacidad de desarrollo *in vitro* de ovocitos bovinos provenientes de vacas con predominancia fenotípica *Bos taurus* y *Bos indicus*. *SciELO*, (20) 3.
- Barth, A. (1992). The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: *Proceedings 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction*, 47–63.
- Bonilla, L.; Mejía, A.; Gómez, R.; Torres, M.; Uribe, F. (2018). Viabilidad y tasa de preñez de embriones producidos *in vitro* a partir de semen sexado comparado con semen convencional en *Bos taurus* y *Bos indicus*. *Rev Inv Vet Perú*, (4) 1377-1385.
- Brero, A.; Leonhardt, H.; Cardoso, M. (2006). Replication and translation of epigenetic information. *Curr Top Microbiol Immunol*, (301) 21–44.
- Casas, A.; Cianzio, D.; Rivera, A.; Cantisani, L.; Añeses, L. (2001). Estimación de la edad del ganado vacuno por sus incisivos. *Estación Experimental Agrícola*, (299) 1-6.
- Correa, J.; Pace, M.; Zavos, P. (1997). Relationships among frozen–thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program, *Theriogenology* (48) 721–731.
- Dayan, A. (2001). Factores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*. Tese magistral.
- Decuadro, H.; Hansen, G. (2000). Fertilidad de los toros de inseminación artificial: Algunos factores de variación. *IMV Technologies France. Centre d'Insémination artificielle de L' Aigle, France*.
- De Loos, F.; Van Maurik, P.; Van Beneden, T.; Kruip, A.M. (1992). Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev*, (31) 208-214.
- Gonzales, A.; Díaz, A. y Díaz-Anzaldúa, A. (2008). La epigenética y los estudios en gemelos en el campo de la psiquiatría. *Salud Mental*, (31) 230.

- Fernandez, A.; Bastidas, P.; Troconiz, J. (1999). Fertilización *in vitro* de ovocitos recolectados de vacas cebú postmortem. *Rev. Fac. Cs. Vets*, (2) 89-100.
- Foote, R. (2003). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci*, (75) 119–39.
- Gadea, J.; Matas, C.; Lucas, X. (1998). Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. *Anim Reprod Sci*, (54) 95–108.
- Gadea, J.; Selles, E.; Marco, M.A. (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod Domest Anim* 2004, (39) 1–6.
- Gillan, L.; Kroetsch, T.; Maxwell, W.M.; Evans, G. (2008). Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, (103) 201-214.
- Graham, J. & Mocé, J. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, (64) 492-504.
- González, G y Campos, D. (2013). *Nutrición del toro y calidad seminal*. Facultad de ciencias veterinarias, Universidad de Buenos Aires; Argentina.
- Gordon, I.; Lu, H. (1990). Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, (33) 77-87.
- Hay, M.A.; King, W.A.; Gartley, C.J.; Leibo, S.P.; Goodrowe, K.L. (1997). Canine spermatozoa — cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology*, (48) 1329–1342.
- Hernández, H.F. (2005). Fecundación *in vitro*. *Manual de Ganadería Doble Propósito*. 615-619.
- Hirao, K. (1975). A multiple regression analysis on six measurements of bovine semen characteristics for fertility. *Int. J. Fertil*, (20) 204–208.

- Holt, W.V.; Brienj, O.; Abaigar, T. (2007). Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development*, (19) 709–718.
- Januskauskas, A.; Johannisson, A.; Soderquist Y.L.; Rodríguez-Martínez, H. (2000). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bull. *Theriogenology*, (53) 859–875.
- Kjaestad, H.; Ropstad, E.; Andersen Berg, K. (1993). Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. *Acta Vet. Scand*, (34) 299–303.
- Larsson, B; Rodríguez-Martínez, H. (2000). Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility. *Animal Reproduction Science*, 60–61:327–336.
- Lonergan, P.; Fair, T.; Corcoran, D.; Evans. A. (2006). Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, (65) 137–152.
- Medina, M.; Cattaneo, L.; Caballero, J.; Cerrate, H.; Panarace, M.; Ferré, L.; Dalla, M. (2002). Semen sexado y congelado en Argentina. Resultados de su utilización en programas de inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in vitro*. *Taurus*, (13) 4–8.
- Palmer, E.; Bezard, J.; Magistrini, M.; Duchamp, G. (1991). *in vitro* in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fertil*, (44) 375–384.
- Parrish, J.J.; Krogenaes, A.; Susko-Parrish, J.L. (1995). Effect of bovine sperm separation by swimup or percoll on success of in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology*, (6) 859-869.
- Perez, L.; Valcarcel, A.; De Las Heras, M.; Baldassarre, H. (1997). Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen–thawed samples, *Reprod. Domest. Anim* (32) 157–160.
- Presicce, G.A.; Jiang, S.; Sinkin, M.; Yang, X. (2011). Oocyte quality and embryo development in prepubertal calves. *Biology of Reproduction*, (52) 127.



- Puglisi, R.; Vanni, R.; Galli, A.; Balduzzi, D.; Parati, K.; Bognioni, G.; Crotti, G.; Duchi, R.; Galli, C.; Lazzari, G.; Aleandri, R. (2006). *in vitro* fertilisation with frozen-thawed bovine sperm sexed by flow cytometry and validated for accuracy by real-time PCR. *Reproduction*, (3) 519-26.
- Quintero, A.; Mayorga, J.; Cardona, W. (2017). El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *Journal of Veterinary Andrology*, ISSN 2542-3045, (2) 31.
- Rizos, D.; Lonergan, P.; Ward, F.; Duffy, P.; Boland, M.P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev*, (61) 234–248.
- Rubio, J.; Gonzáles, D.; González, Y.; Madrid, N.; Quintero, A. (2007). ¿Puede el ORT complementar las pruebas clásicas de valoración seminal y predecir la fertilidad en toros. *Arch. Latinoam .Prod. Anim*, (1) 329.
- Sato, E.; Matsuo, M.; Miyamoto, H. (1990). Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Anim. Sci*, (68) 1872-1887.
- Shamsuddin, M.; Larsson, B. (1993). *in vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod. Domest. Anim*, (28) 77–84.
- Shi, D.; Lu, K.; Gordon, I. (1990). Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*. *Theriogenology*, (33) 324.
- Tardif, S.; Laforest, J.; Cormier, N.; Bailey, J. (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology*, (52) 447–59.
- Tello Flores; L.A. (2017). *Efecto del consumo residual de alimento (RFI) sobre la fertilidad en toretes Angus y Hereford en el Estado de Chihuahua, México* (tesis de pregrado). Escuela superior politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Torrado, I.; Aranda, M.; Gómez, V.; Bravo, J.; Constantino, J. (2016). Utilización de la electroeyaculación para la evaluación de la aptitud reproductiva potencial del

- toro en sistemas extensivos en la comunidad autónoma de Extremadura. *Archivos de Zootecnia*, (265) 327-332.
- Torres Armas, E. (2013). *Métodos Estadísticos para la Investigación Experimental*. Chachapoyas, Perú: Biblioteca Nacional del Perú.
- Trigal, B.; Gómez, E.; Caamaño, J. N.; Muñoz, M.; Moreno, J.; Carrocera, S.; Martín, D. & Diez, C. (2012) *in vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology*, (7) 1465-1475.
- Urrego, R.; Tarazona, A.; Olivera, M.; Camargo, O. (2008). Simplificación de la fertilización de ovocitos durante la producción *in vitro* de embriones bovinos. *Rev. Col. Cien. Pec.*, (3) 398-405.
- Vajta, G.; Peura, T.T.; Holm, P.; Páldi, A.; Greve, T.; Trounson, A.O.; Callesen, H. (2000). New method for culture of zona-included or zona free embryos: the well-of-the-well (WOW) system. *Mol Reprod Dev.*, (55) 256–264.
- Watanabe, Y.F.; Watanabe, M.R.; Dayan, A.; Vila, R.A.; Lôbo, R.B. (1998) Competência de oócitos, oriundos de diferentes fêmeas bovinas, na produção *in vitro* de blastocistos. *Arq. Fac. Vet.*, (26) 384-385.
- Wilson, R. D.; Fricke, P. M.; Leibfried-Rutledge, M. L.; Rutledge, J. J.; Penfield, C. M.; Weigel, K.A. (2006). *in vitro* production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology*, (6) 1007-15.
- 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. *J Anim Sci*, (76) 3079–89.
- Zhang, B.; Larsson, B.; Lundeheim, N.; Rodríguez-Martínez, H. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen–thawed semen from dairy AI bulls. *Int. J. Androl*, (21) 207–216.

## ANEXOS

### Anexo 1: Resultados generales de la investigación

Tabla 3: Resultados de las pruebas in vitro del toro JTRM

Nombre del toro	Repeticiones	Óvulos a Madurar	Óvulos Maduros	Motilidad Post Descongelación %	Óvulos Fecundados	Bi	Bl	Bx	TE
JTRM	1	25	18	30	16	3	1	0	4
JTRM	2	25	18	30	9	1	1	0	2
JTRM	3	25	18	25	9	1	1	0	2
JTRM	4	25	18	25	11	2	1	0	3
JTRM	5	25	18	25	12	2	1	0	3
JTRM	6	25	18	30	6	2	0	0	2
JTRM	7	25	18	30	4	1	0	0	1
JTRM	8	25	18	15	7	1	1	0	2
JTRM	9	25	18	30	13	1	0	0	1
JTRM	10	25	18	30	13	4	0	0	4
JTRM	11	25	18	35	13	7	0	1	8
JTRM	12	25	18	35	9	1	1	0	2
JTRM	13	25	18	25	12	2	1	0	3
JTRM	14	25	18	30	6	2	0	0	2
JTRM	15	25	18	30	9	1	1	0	2
JTRM	16	25	18	15	7	1	1	0	2
JTRM	17	25	18	25	9	1	1	0	2
JTRM	18	25	18	30	16	3	1	0	4
JTRM	19	25	18	30	13	4	0	0	4
JTRM	20	25	18	25	11	2	1	0	3
JTRM	21	25	18	35	9	1	1	0	2
JTRM	22	25	18	35	13	7	0	1	8
JTRM	23	25	18	30	4	1	0	0	1
JTRM	24	25	18	30	13	1	0	0	1
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>600</b>	<b>432</b>		<b>244</b>	<b>52</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>68</b>
<b>Promedio%</b>				<b>28.33</b>	<b>56.48</b>	<b>21.31</b>	<b>5.73</b>	<b>0.82</b>	<b>27.86</b>

Bi: blastocistos iniciales. Bl: blastocistos. Bx: blastocistos expandidos. TE: total de embriones

Tabla 4: Resultados de las pruebas in vitro del toro VTRM

Nombre del toro	Repeticiones	Óvulos a Madurar	Óvulos Maduros	Motilidad Post Descongelación %	Óvulos Fecundados	Bi	Bl	Bx	TE
VTRM	1	25	18	20	11	2	1	0	3
VTRM	2	25	18	20	5	1	0	0	1
VTRM	3	25	18	20	9	1	1	0	2
VTRM	4	25	18	20	9	1	1	0	2
VTRM	5	25	18	20	8	1	1	0	2
VTRM	6	25	18	20	5	1	0	0	1
VTRM	7	25	18	35	3	1	0	0	1
VTRM	8	25	18	35	2	0	0	0	0
VTRM	9	25	18	20	8	1	1	0	2
VTRM	10	25	18	20	3	0	0	0	0
VTRM	11	25	18	35	11	2	1	0	3
VTRM	12	25	18	35	14	2	1	1	4
VTRM	13	25	18	35	3	1	0	0	1
VTRM	14	25	18	20	8	1	1	0	2
VTRM	15	25	18	20	3	0	0	0	0
VTRM	16	25	18	20	11	2	1	0	3
VTRM	17	25	18	35	11	2	1	0	3
VTRM	18	25	18	35	2	0	0	0	0
VTRM	19	25	18	35	14	2	1	1	4
VTRM	20	25	18	20	9	1	1	0	2
VTRM	21	25	18	20	9	1	1	0	2
VTRM	22	25	18	20	5	1	0	0	1
VTRM	23	25	18	20	5	1	0	0	1
VTRM	24	25	18	20	8	1	1	0	2
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>600</b>	<b>432</b>		<b>176</b>	<b>26</b>	<b>14</b>	<b>2</b>	<b>42</b>
<b>Promedio%</b>				<b>25.00</b>	<b>40.74</b>	<b>14.77</b>	<b>7.95</b>	<b>1.13</b>	<b>23.86</b>

Bi: blastocistos iniciales. Bl: blastocistos. Bx: blastocistos expandidos. TE: total de embriones

## Anexo 2: Resultados estadísticos

Tabla 5: Pruebas de normalidad

Variables	Nombre del toro	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Motilidad Post Descongelación %	Toro J	0.812	24	0.000
	Toro v	0.598	24	0.000
N° de Óvulos Fecundados	Toro J	0.945	24	0.211
	Toro v	0.929	24	0.093
N° de Blastocistos Iniciales (Bi)	Toro J	0.693	24	0.000
	Toro v	0.792	24	0.000
N° de Blastocistos (Bl)	Toro J	0.629	24	0.000
	Toro v	0.629	24	0.000
N° de Blastocistos Expandidos (Bx)	Toro J	0.316	24	0.000
	Toro v	0.316	24	0.000
N° Total de Embriones	Toro J	0.757	24	0.000
	Toro v	0.920	24	0.058

En la tabla 5 se observa que los valores de significancia para las variables de número de óvulos fecundados es mayor a 0.05, por lo que se concluye que las variables sigue una distribución normal, mientras que las demás variables la significancia es menor a 0.05 y por lo tanto no siguen una distribución normal, a un nivel de confianza del 95%.

Tabla 6: Estadísticas de grupo

Variable	Nombre del toro	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
N° de Óvulos Fecundados	Toro JTRM	24	10.17	3.384	0.691
	Toro VTRM	24	7.33	3.667	0.749

Tabla 7: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	Gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
										Inferior	Superior
N° de Óvulos Fecundados	Se asumen varianzas iguales	0.288	0.594	2.782	46	0.008	2.833	1.019	0.783	4.884	
	No se asumen varianzas iguales			2.782	45.705	0.008	2.833	1.019	0.783	4.884	

Tabla 8: *Prueba de Mann-Whitney*

Variable	Nombre del toro	N	Rango promedio	Suma de rangos
Motilidad Post Descongelación %	Toro JTRM	24	27.83	668.00
	Toro VTRM	24	21.17	508.00
N° de Blastocistos Iniciales (Bi)	Toro JTRM	24	29.25	702.00
	Toro VTRM	24	19.75	474.00
N° de Blastocistos (Bl)	Toro JTRM	24	24.50	588.00
	Toro VTRM	24	24.50	588.00
N° de Blastocistos Expandidos (Bx)	Toro JTRM	24	24.50	588.00
	Toro VTRM	24	24.50	588.00
N° Total de Embriones	Toro JTRM	24	28.67	688.00
	Toro VTRM	24	20.33	488.00

Tabla 9: *Estadísticos de prueba*

Prueba estadística	Motilidad Post Descongelación %	N° de Blastocistos Iniciales (Bi)	N° de Blastocistos (Bl)	N° de Blastocistos Expandidos (Bx)	N° Total de Embriones
U de Mann-Whitney	208.000	174.000	288.000	288.000	188.000
W de Wilcoxon	508.000	474.000	588.000	588.000	488.000
Z	-1.710	-2.588	0.000	0.000	-2.137
Sig. asintótica(bilateral)	0.087	0.010	1.000	1.000	0.033

a. Variable de agrupación: Tipo de toro

Tabla 10: *Significancia*

Variables	Toro JTRM	Toro VTRM
Motilidad post descongelación %	27.83 <sup>a</sup>	21.17 <sup>a</sup>
N° de óvulos fecundados	10.17±3.384 <sup>a</sup>	7.33±3.667 <sup>b</sup>
N° de blastocistos iniciales	29.25 <sup>a</sup>	19.75 <sup>b</sup>
N° de blastocistos	24.5 <sup>a</sup>	24.5 <sup>a</sup>
N° de blastocistos expandidos	24.5 <sup>a</sup>	24.5 <sup>a</sup>
N° total de embriones	28.67 <sup>a</sup>	20.33 <sup>b</sup>

Valores promedio ± desviación estándar

<sup>a,b</sup> letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativa

### Anexo 3: Panel fotográfico



Figura 7. Recolección de ovarios de camal



Figura 8. Transporte de ovarios al laboratorio



Figura 9. Aspiración de los COCs



Figura 10. Búsqueda, selección y categorización de óvulos





*Figura 11. Maduración in vitro y CIV*



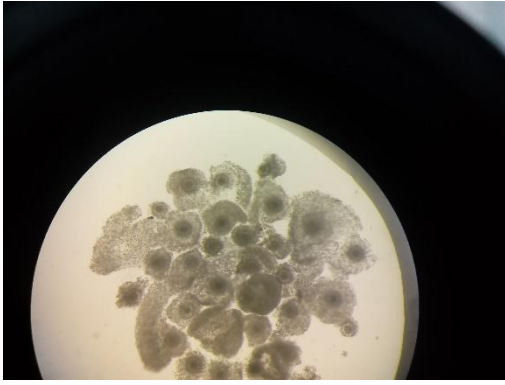
*Figura 12. Descongelamiento de las pajillas*



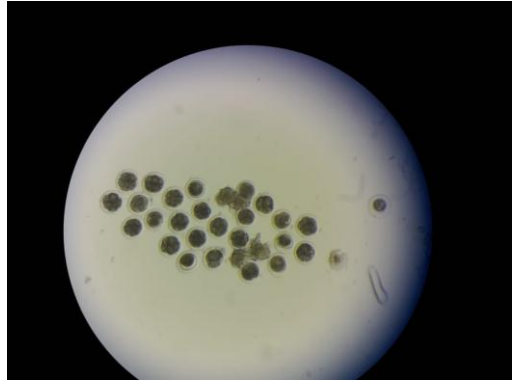
*Figura 13. Evaluación seminal*



*Figura 14. Fertilización in vitro*



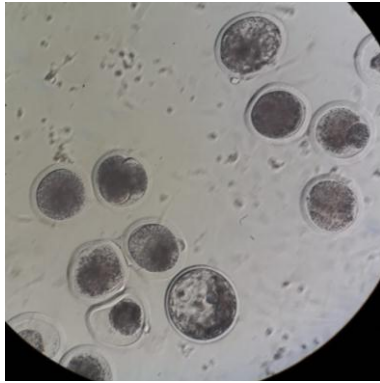
*Figura 15. Óvulos maduros*



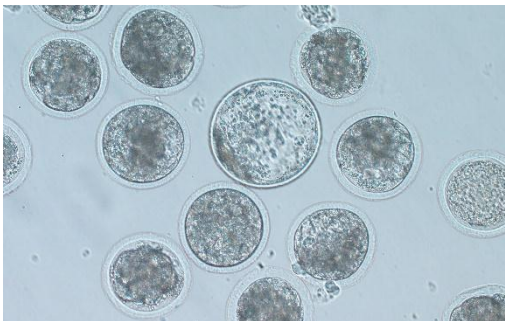
*Figura 16. Óvulos fecundados*



*Figura 17. Blastocisto inicial*



*Figura 18: Blastocisto*



*Figura 19. Blastocisto expandido*