



**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**

**“COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA  
DE BOVINOS GEMELOS HOMOCIGOTOS ABERDEEN  
ANGUS POR CITOMETRÍA DE FLUJO”**

**AUTOR : Bach. Edgar Manuel Acosta Montoya**

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

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2019**

## DEDICATORIA

*A Dios, rey del cielo y del universo, quien me dio vida y fortaleza, por guiarme en mis pasos y hoy lograr ser un profesional, especialmente gracias por su grandeza y protección infinita.*

*A mis padres Segundo Nicolás Acosta Ruiz y Rosa Victoria Montoya Vargas, por ofrecerme su amor, sus palabras de apoyo y por dedicarse especialmente para llegar a lograr una de mis metas; a mis hermanos, abuelos y tíos por darme su apoyo incondicional para poder lograr cumplir este sueño de ser profesional.*

*Edgar Manuel Acosta Montoya.*

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco a Dios, quien es el creador de todas las cosas, el que me ha dado la fortaleza para lograr este anhelado sueño; por guiarme en el sendero correcto de la vida, a mis padres, por ser mi ejemplo de vida y entregarme todo su amor.*

*A mi asesor M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama por su confianza y apoyo como gran profesional, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto que sin lugar a duda es tan importante para mi futuro como profesional, mil gracias por su gran estima y consideración.*

*A la M.Sc. Gleni Tatiana Segura Portocarrero por el gran apoyo brindado en el Laboratorio de Biotecnología y Reproducción Animal de la UNTRM-A agradezco ese valioso tiempo entregado para realizar este proyecto, y a mi facultad la FIZAB por darnos esta oportunidad que es de gran valor para nuestro éxito profesional.*

*Al Dr. Joel de León Delgado por su apoyo en el manejo e interpretación de datos en citometría de Flujo. Y al Dr. Octavio Fabián Bao Tarragó por su apoyo en el trabajo práctico de morfología en el presente proyecto de tesis. A ustedes muchas gracias.*

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRIGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARPIO CHAUCA VALQUI

*Rector*

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GUBILLÓN

*Vicerrector Académico*

Dra. FLOR TERESA GARCIA HUAMÁN

*Vicerrectora de Investigación*

M.Sc. NILTON LUIS MURGA VALDERRAMA

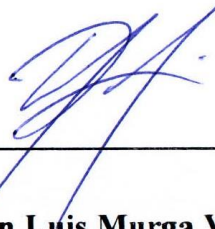
*Decano de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología*

## VISTO BUENO DEL ASESOR

El docente de la UNTRM-A que suscribe, hace constar que ha asesorado la tesis titulada **“Comparación de la viabilidad espermática de bovinos gemelos homocigotos Aberdeen Angus por citometría de flujo”**, del Bachiller en Ingeniería Zootecnista egresado de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología de la UNTRM-A.

- **Bach. Edgar Manuel Acosta Montoya.**

El docente de la UNTRM-A que suscribe da su Visto Bueno para que la Tesis mencionada sea presentada al Jurado Evaluador, manifestando su voluntad de apoyar al tesista en el levantamiento de observaciones y en el Acto de sustentación de Tesis.



---

**M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama**  
Docente nombrado a tiempo completo de la UNTRM

## JURADO DE TESIS



---

Ing. CESAR AUGUSTO MARAVÍ CARMEN

*Presidente*



---

M.Sc. JONATHAN ALBERTO CAMPOS TRIGOSO

*Secretario*



---

Ph.D. ILSE SILVIA CAYO COLCA

*Vocal*



**ANEXO 3-K**

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

Yo Edgar Manuel Acosta Montoya  
identificado con DNI N° 73230345 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: Comparación de la Viabilidad Espermática  
de Bovinos Gemelos Homocigotos Aberdeen Angus por  
Citometría de Flujo



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, 11 de Diciembre de 2019

Firma del(a) tesista



**ANEXO 2-N**

**ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS**

En la ciudad de Chachapoyas, el día 11 de Diciembre del año 2019, siendo las 04:00 pm horas, el aspirante: Edgar Manuel Acosta Montoya defiende públicamente la Tesis titulada: Comparación de la Viabilidad Espermática de Bovinos Gemelos Homocigotos Aberdeen Angus por Citometría de Flujo. para optar el Título Profesional en Ingeniero Zootecnista otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado, constituido por:  
 Presidente: Ing. Cesar Augusto Maravi Carmen  
 Secretario: Mg. Jonathan Alberto Campos Trigo  
 Vocal: Ph.D. Ilse Silvia Cayo Colca



Procedió el (los) aspirante (s) a hacer la exposición de los antecedentes, contenido de la tesis y conclusiones obtenidas de la misma, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la tesis presentada, los miembros del jurado pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones u objeciones consideran oportunas, las cuales fueron contestadas por el los aspirante (s).

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

Seguidamente, a puerta cerrada, el jurado determinará la calificación global concedida a la tesis, en términos de:

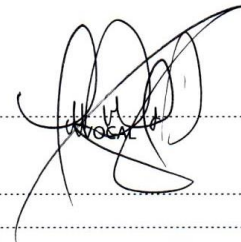
Notable o sobresaliente ( )    Aprobado (X)    No apto ( )

Otorgada la calificación el presidente del Jurado comunica, en sesión pública, la calificación concedida. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las horas 05:00 pm del mismo día, el jurado concluye el acto de sustentación del Trabajo de Investigación.

  
PRESIDENTE

  
SECRETARIO

  
VOCAL

OBSERVACIONES: .....



## ÍNDICE

<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>iii</b>
<b>AUTORIDADES DE LA UNTRM-A .....</b>	<b>iv</b>
<b>VISTO BUENO DEL ASESOR.....</b>	<b>v</b>
<b>JURADO DE TESIS.....</b>	<b>vi</b>
<b>DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRAT.....</b>	<b>xv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Ubicación.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Materiales .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Diseño de la investigación.....</b>	<b>20</b>

<b>2.4</b>	<b>Procedimientos para la colecta, manejo y análisis del semen. ....</b>	<b>21</b>
<b>2.5</b>	<b>Análisis macroscópico.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Análisis microscópico.....</b>	<b>24</b>
<b>2.7</b>	<b>Análisis de la viabilidad por citometría de flujo. ....</b>	<b>27</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Detalle del resultado de las características macroscópicas y microscópicas. ....</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Detalle del resultado de viabilidad y fluorescencia natural.....</b>	<b>36</b>
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>42</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>45</b>
	<b>Anexo 01: Resultados estadísticos de cada prueba. ....</b>	<b>45</b>
	<b>Anexo 02: Panel fotográfico. ....</b>	<b>48</b>
	<b>Anexo 03: Graficas de los resultados mediante la citometría de flujo.....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1: Materiales de colecta, evaluación microscópica y citometría de flujo. ....</b>	<b>20</b>
<b>Tabla 2: Circunferencia escrotal. ....</b>	<b>21</b>
<b>Tabla 3: Escala basada en el porcentaje de células móviles. ....</b>	<b>24</b>
<b>Tabla 4: Resultados de las estadísticas de grupo. ....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 5: Resumen de datos macroscópicas y microscópicas del toro J-TRM ....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 6: Resumen de datos macroscópicas y microscópicas del toro V-TRM.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 7: Datos de J-TRM obtenidos por el citometro de flujo. ....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 8: Datos de V-TRM obtenidos del citometro de flujo.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 9: Datos de cada variable estudiada. ....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 10: Pruebas de normalidad de las características macro y microscópicas ....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 11: Pruebas de normalidad de viabilidad y fluorescencia natural. ....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 12: Estadísticos de prueba.....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 13: Pruebas de muestras independientes. ....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Mapa de localización de estudio.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 2: Conteo de espermatozoides en la Cámara Neubauer. ....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 3. Resultados del pH.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. Volumen de J-TRM y V-TRM. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 5. Motilidad masal de J-TRM y V-TRM.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 6. Motilidad individual de J-TRM y V-TRM. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 7. Resultados de concentración. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 8. Resultados de morfología.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 9. Viabilidad espermática de J-TRM y V-TRM con PI. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 10. Preparación del clon J-TRM y V-TRM para la colecta de semen.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 11. Circunferencia escrotal de J-TRM .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 12. Circunferencia escrotal de V-TRM .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 13. Estimulación del toro .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 14. Colecta del semen. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 15. Semen colectado.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 16. Identificación de la muestra .....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 17. Traslado del semen al laboratorio .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 18. Criopreservación del semen .....</b>	<b>50</b>

<b>Figura 19. Evaluación del semen de V-TRM .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 20. Evaluación de la morfología. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 21. Evaluación de la viabilidad.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 22. Lavado de la muestra.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 23. Centrifugación del semen. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 24. Muestra colocada al citometro de flujo. ....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 25. Eventualidad del analisis. ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 26. Sistema de análisis canales de visualización. ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 27. Formación de graficas e histogramas.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 28. Comparación de niveles.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 29. Resultado de viabilidad de J-TRM.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 30. Resultado de fluorescencia natural de los espermatozoides.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 31. Tamaño del espermatozoide.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 32. Visualización del espermatozoide. ....</b>	<b>54</b>

## RESUMEN

La viabilidad espermática está reflejada por la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, relacionada con la fertilidad del animal; existiendo variaciones entre métodos de análisis. El objetivo de la investigación fue comparar la viabilidad espermática de bovinos gemelos homocigotos Aberdeen Angus por citometría de flujo. Se trabajó con 10 colectas cada uno usando tres repeticiones por colecta, evaluando características macroscópicas (volumen y pH), microscópicas (motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática y morfología), fluorescencia natural (control) y viabilidad con PI por citometría de flujo. Se trabajó con un diseño comparativo simple, con una normalidad de 95%, se realizó una prueba t de student (prueba paramétrica), encontrándose volúmenes de  $6.49 \pm 0.87$  (J-TRM) y  $6.08 \pm 0.87$  (V-TRM), en daños morfológicos  $14.50 \pm 2.32\%$  (J-TRM) y  $15.40 \pm 2.17\%$  (V-TRM) respectivamente, con una concentración espermática de  $1040 \times 10^6 \pm 146.82$  (J-TRM) y  $1073 \times 10^6 \pm 84.73$  (V-TRM), con una fluorescencia natural (control) de  $0.034 \pm 0.011\%$  (J-TRM) y  $0.033 \pm 0.014\%$  (V-TRM) y finalmente la viabilidad fue de  $43.19 \pm 9.93\%$  (J-TRM) y  $47.16 \pm 9.68\%$  (V-TRM). Así mismo, se realizó la prueba de U de Mann-Whitney y wilcoxon (prueba no paramétrica), obteniendo un pH de 6.57 (J-TRM) y 6.62 (V-TRM), motilidad masal 3.4 (J-TRM) y 3.5 (V-TRM) y motilidad individual 3.8 (J-TRM) y 4 (V-TRM), respectivamente. Finalmente se muestran mejores características espermáticas a favor del ejemplar V-TRM.

**Palabras clave:** Semen, motilidad, fluorescencia, Ioduro de propidio.

## ABSTRAT

The sperm viability is reflected by the integrity of the plasma and acrosomal membrane, related to the fertility of the animal; existing variations between analysis methods. The objective of the research was to compare the sperm viability of Aberdeen Angus homozygous twin cattle by flow cytometry. We worked with 10 collections each using three repetitions per collection, evaluating macroscopic characteristics (volume and pH), microscopic (mass motility, individual motility, sperm concentration and morphology), natural fluorescence (control) and viability with propidium iodide staining by flow cytometry. We worked with a simple comparative design, with a normality of 95%, a student t test (parametric test) was performed, finding volumes of  $6.49 \pm 0.87$  (J-TRM) and  $6.08 \pm 0.87$  (V-TRM), in damage Morphological  $14.50 \pm 2.32\%$  (J-TRM) and  $15.40 \pm 2.17\%$  (V-TRM) respectively, with a sperm concentration of  $1040 \times 10^6 \pm 146.82$  (J-TRM) and  $1073 \times 10^6 \pm 84.73$  (V-TRM), with a natural fluorescence (control) of  $0.034 \pm 0.011\%$  (J-TRM) and  $0.033 \pm 0.014\%$  (V-TRM) and finally the viability was  $43.19 \pm 9.93\%$  (J-TRM) and  $47.16 \pm 9.68\%$  (V-TRM). Likewise, the Mann-Whitney and Wilcoxon U test (non-parametric test) was performed, obtaining a pH of 6.57 (J-TRM) and 6.62 (V-TRM), mass motility 3.4 (J-TRM) and 3.5 (V-TRM) and individual motility 3.8 (J-TRM) and 4 (V-TRM), respectively. Finally, better sperm characteristics are shown in favor of the V-TRM specimen.

**Keywords:** Semen, motility, fluorescence, propidium odide.

## I. INTRODUCCIÓN

La determinación de la viabilidad celular es el conteo de las células vivas o muertas en una muestra. Genéricamente se considera que la clonogenicidad o viabilidad reproductiva son sinónimos de viabilidad celular. Las células vivas con membranas intactas se caracterizan por su habilidad para excluir colorantes que fácilmente penetran la membrana plasmática de células muertas o dañadas. La tinción de células no viables con Ioduro de propidio ha sido ampliamente probada en diversos tipos celulares. Su amplia aplicación se debe a que es un procedimiento fácil de realizar y las células teñidas son fácilmente identificadas (Cortés *et al.*, 2014).

La citometría de flujo es ahora una metodología reconocida dentro de la espermatología animal, y ha pasado de ser una herramienta de investigación para convertirse en rutina en la evaluación de semen animal destinados a la cría. La disponibilidad de los citómetros de flujo 'sobremesa' y de los marcadores nuevos y versátiles para la estructura y función celular había permitido la instrumentación para medir varios parámetros del espermatozoide, la viabilidad de reactividad cuando se expone a estímulos exógenos, y aumentar nuestras capacidades para ordenar los espermatozoides para potenciar la capacidad de fertilización, o el sexo cromosómico (Sharoare *et al.*, 2011).

Uhler *et al.* (1993), midieron el estado acrosomal de los espermatozoides mediante el uso de un citómetro de flujo; luego los separaron en un clasificador celular y los observó mediante microscopía de fluorescencia. Ellos mostraron una estrecha correlación entre ambos métodos. La citometría de flujo también se ha utilizado para determinar el estado acrosomal de los espermatozoides detectados con lectinas o anticuerpos monoclonales.

El conocimiento de la fertilidad o de la capacidad fecundante de cada toro es uno de los principales objetivos en la producción de semen bovino. Un requisito indispensable para el desarrollo de la inseminación artificial es que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilidad después de haber sido criopreservado (Hidalgo-Ordoñez *et al.*, 2005).



En la ciencia médica son importantes los gemelos para realizar evaluaciones de enfermedades y resistencias hereditarias. En animales clonados existen discrepancias epigenéticas que se asocian con diferencias en ciertos rasgos; estudios recientes manifiestan que a mayor edad se incrementan las diferencias de las características epigenéticas, esto se acentúa si los individuos se desarrollan en distintas zonas, por la acción de ser expuestos a diferentes ambientes (González *et al.*, 2008).

Se conoce que los gemelos no siempre presentan las mismas características fenotípicas o productivas y estas diferencias son estudiadas a través de la epigenética que es una ciencia que estudia las variaciones hereditarias que ocurren sin que cambie la secuencia del ADN, es decir, sin que se altere la lectura de las bases nitrogenadas A, C, G y T, 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 (Neissa y Guerrero, 2014).

Hasta la fecha no existe información relacionado a investigaciones en comparación de la viabilidad espermática de bovinos gemelos homocigotos por citometría de flujo. Sin embargo, este equipo es muy reconocido en investigaciones relacionado a la Medicina Humana y recientemente se le está dando un uso en investigaciones relacionado a la Zootecnia.

En la actualidad existen experimentos en los que se han combinado métodos fluorescentes con un citómetro de flujo modificado para el análisis de esperma bovino en estaciones de inseminación artificial y en los laboratorios. Al usar una versión modificado de un citómetro clínico se ha desarrollado un método rápido, preciso que permite la selección del mejor semen. El citómetro de flujo evalúa la calidad, estructura, función y motilidad del esperma luego de ciclos de congelación y/o descongelación; para valorar daños en el esperma y su calidad para la fertilización (Laguado, 2007).

La concentración espermática es una característica necesaria para medir el promedio de ejemplares para ser reproducidos, de esta manera, existen métodos como la espectrofotometría, la colorimetría, la citometría de flujo y la cámara de recuento celular, como las de Bürker, Neubauer o Thoma. La espectrofotometría, técnica usada en nuestro laboratorio, es un método indirecto, que mide la luz monocromática absorbida por las partículas en suspensión o los espermatozoides (Hidalgo-Ordoñez *et al.*, 2005).

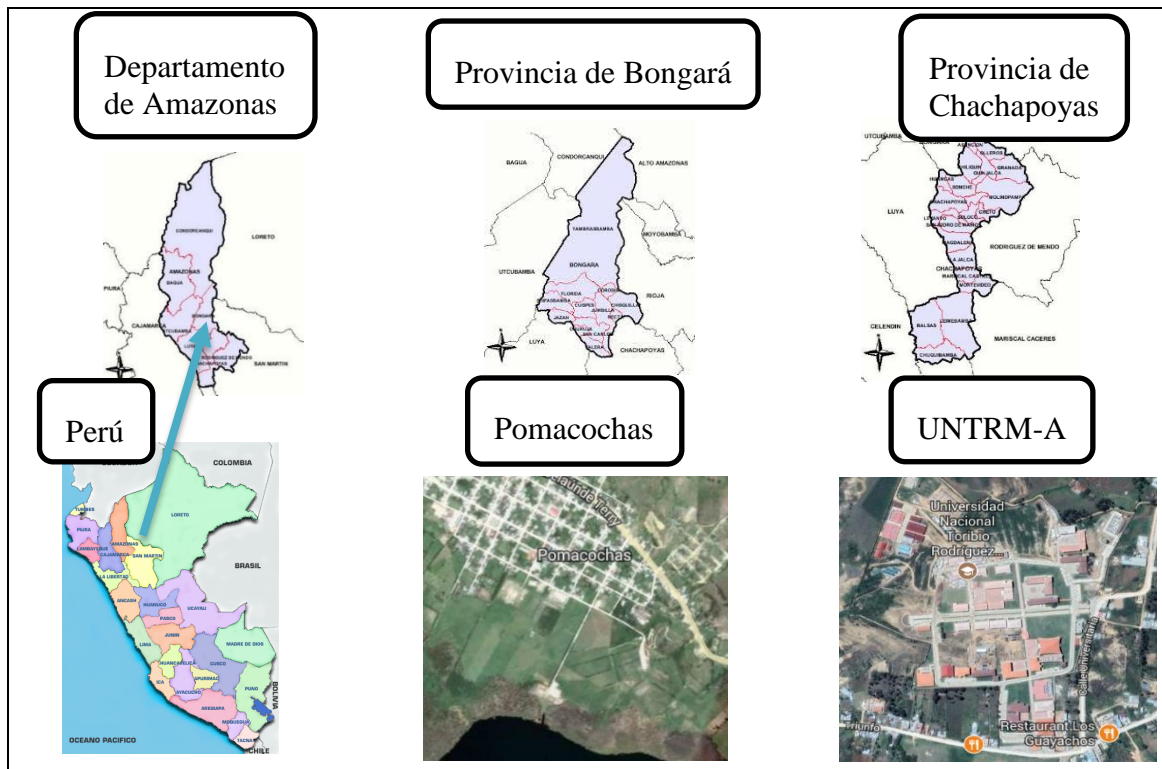
Prado (2012), menciona que la motilidad permite predecir la fertilidad o habilidad para congelar, ya que la motilidad post descongelación es frecuentemente usada para ajustar la concentración de espermatozoides por pajilla, cuando el semen se designa para Inseminación Artificial la motilidad progresiva también puede ser evaluada siguiendo la velocidad de movimiento o grado de movimiento.

En muchas ocasiones los machos de las diferentes especies son seleccionados en base a su pedígrree, a los registros de sus ancestros de buena calidad genética, además de su conformación o fenotipo; sin embargo, tales características no garantizan que dichos animales produzcan gametos que sean capaces de dejar a las hembras preñadas. Por lo que de manera rutinaria es necesario realizar evaluaciones de la calidad seminal de los machos, especialmente de aquellos en los que no se tienen registros de su desempeño a través de las crías, como las pruebas de progenie, cuando se trata de machos primerizos (Cano y Pérez, 2013).

## II. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1 Ubicación.

El trabajo de investigación se realizó en el Centro Experimental Pomacochas -UNTRM-A, de la provincia Bongará, región Amazonas, y en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la UNTRM, sede principal en el distrito y provincia de Chachapoyas, región Amazonas, Perú.



**Figura 1.** Mapa de localización de estudio.

## 2.2 Materiales

**Tabla 1:** *Materiales de colecta, evaluación microscópica y citometría de flujo.*

<b>Materiales</b>	<b>Materiales químicos, biológicos</b>	<b>Equipos</b>
Set de pipetas (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Diluyente para semen (AndroMed®).	Tanque de nitrógeno líquido 7 litros MVE.
Tips 200 µL, 1000 unidades	Ioduro de propidio 500 g	Citometro de flujo
Tips 1000 µL, 1000 unidades	Alcohol de 70°	Platina térmica
Tips 10 µL, 1000 unidades	Alcohol de 96°	Empajilladora
Cubre y porta objetos	PBS	Centrifuga
Racks para microtubos 1.5 mL	Aceite de inmersión	Incubadora
Microtubo con tapa de 1.5 mL, 500 unidades	NaCl	Microscopio Óptico
Tubos de 150 ML (Bolsa x 20 unidades).	Eosina-Nigrosina	Baño Maria
Pajillas de 0.25 (Paquete x 100).	Agua	Cámara de Neubauer
Mascarillas (Caja x 100 unidades).	Nitrógeno líquido	Cámara de esterilización

## 2.3 Diseño de la investigación

La presente investigación consta de un diseño no experimental descriptivo transversal donde las variables no se modifican, teniendo resultados que se compararon a otras investigaciones.

**M** → **AM** → **AR**

Diseño de investigación descriptiva.

**M:** Muestra

**AM:** Análisis de muestra

**AR:** Análisis de resultados

## 2.4 Procedimientos para la colecta, manejo y análisis del semen.

### a) Examen andrológico de la circunferencia escrotal.

Se midió la circunferencia escrotal con cinta métrica a cada ejemplar. Es esencial realizar un examen andrológico del semental antes de la colecta del semen, con la finalidad de conocer si cumple con la medida establecida, de acuerdo a la edad del animal. Según Mellisho (2010), el tamaño de los testículos está directamente relacionado con el potencial de producción de espermatozoides, por que el 80% del volumen del testículo está ocupado por los túbulos seminíferos. Siendo una circunferencia excelente  $\geq 37$  cm a partir de 36 meses de edad para adelante.

**Tabla 2:** *Circunferencia escrotal.*

<b>TORO</b>	<b>EDAD</b>	<b>Circunferencia Escrotal (cm)</b>
J-TRM	2.5 AÑOS	34.5
V-TRM	2.5 AÑOS	37.5

### b) Estimulación sexual antes de la monta.

Se ubicó a uno de los toros en un brete con el objetivo de simular a la hembra. Luego se acercó al toro lo más cerca posible, permitiéndole oler al otro toro para que se estimule, se realizó varios intentos de monta en el que se vio una mayor excitación, logrando un buen volumen y concentración seminal que se esperaba.

### c) Colecta del semen.

Se realizó una limpieza de los vellos del prepucio de los dos ejemplares con ayuda de una tijera. Luego, se colocó agua temperada entre 45-50°C a la vagina artificial con la finalidad de mantener la temperatura adecuada hasta obtener el salto. Posteriormente, en un extremo de la vagina artificial se le acopló un cono flexible de látex y un tubo colector de plástico de 15 mL, sujetados por unos jebes elásticos, siempre protegido de la luz directa y la temperatura exterior por una funda termoaislante.

## **2.5 Análisis macroscópico.**

Se debe de considerar de manera conjunta las dos evaluaciones seminales, tanto la macroscópica como la microscópica para emitir el diagnóstico definitivo de la calidad de la muestra. En lo referente a las características macroscópicas, al referirnos al volumen se ha observado que cuando se tiene un volumen elevado hay una concentración menor de espermatozoides. Por el contrario, en la mayoría de las especies, cuando el eyaculado tiene un volumen pequeño, la concentración espermática es muy elevada (Cano y Pérez, 2013).

### **a. Volumen del eyaculado.**

Para la evaluación del volumen del eyaculado se retiró el tubo falcón graduado de 15 mL colocado en el extremo de la vagina artificial, para luego realizar el diagnóstico del volumen con la lectura por medio de las graduaciones que presentó dicho recipiente. Además a cada toro se colocó una funda protectora en la vagina artificial con la finalidad de proteger al semen de los rayos de sol y mantener una temperatura adecuada.

### **b. Evaluación del pH.**

Se evaluó el semen mediante el uso del pHmetro electrónico, para eso se colocó el tubo falcón con el semen en una gradilla de metal, luego se sumergió la punta del medidor de pH sobre el semen para su correspondiente lectura por un tiempo aproximado de 5 minutos hasta indicar el resultado.

Se trasladó el semen al laboratorio en unas alícuotas para ser analizados y se le diluyó en unos tubos falcón de 50 mL bien cerrados, y en seguida se colocó en un equipo de transporte llamado Equitainer, el cual mantiene las muestras a una temperatura de 5 °C. Posteriormente, se trasladó al laboratorio donde se realizó la comparación a los estándares óptimos de pH en semen.

**c. Empajillado.**

Se tomó una cantidad de pajillas vacías de 0.5 mL con la respectiva identificación del toro y se colocó en el empajillador donde el equipo procedió a inyectar el semen diluido puesto en un cono, que conectado al inyector, llenaba y sellaba a cada una de ellas.

**d. Congelación de pajillas de semen.**

Se colocó una cantidad de nitrógeno líquido en una caja de tecnopor hasta un cierto nivel, esperando que no alcancen a las pajillas que se colocaron sobre una rejilla metálica, después se tapó la caja y se midió la temperatura con ayuda de una termocupla con un descenso lento de 10 a 15 °C por minuto de tiempo transcurrido, hasta alcanzar los -140 °C por durante unos 15 minutos. Luego de indicada dicha temperatura se pasó todas las pajuelas a una caja pequeña de tecnopor con nitrógeno líquido con una temperatura de -196 °C, y finalmente se colocó las pajillas selladas en unos goblets con identificación plegados en unas varillas que posteriormente se llevó a un tanque de nitrógeno, donde se conservaron hasta realizar el análisis post descongelamiento.

## 2.6 Análisis microscópico.

Las características microscópicas que se evaluaron con semen de los clones fueron: Motilidad masal, Motilidad individual, Concentración espermática y Morfología.

### a. Motilidad masal.

Se colocó una gota de semen en fresco de 3 a 5 mm de diámetro, colocada sobre un portaobjetos calentado en una platina de calefacción a 37.5 °C, sin el uso de cubreobjetos. La observación se realizó con un aumento de 40x. Luego se observó a los espermatozoides en forma de olas o remolinos. Así mismo, es importante destacar que la motilidad es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal según Mellisho (2010).

### b. Motilidad individual.

Se realizó la dilución del semen en fresco en una solución isotónica de NaCl - al 0,9%, que ayudó a observar individualmente a los espermatozoides. Así mismo, se tomó con una pipeta 1 gota (de 10 µL) del semen, se colocó sobre un portaobjeto a temperatura de 37°C y se cubrió con un cubreobjetos. Se observó con el microscopio de contraste de fase a 100x, se realizó la evaluación viendo si más de la mitad de los espermatozoides que hubo en el campo poseían movimiento o no (Prado, 2012).

**Tabla 3:** *Escala basada en el porcentaje de células móviles.*

Valor descriptivo	Células móviles
Muy buena	80 – 100 % de células móviles
Buena	60 – 79 % de células móviles
Regular	40 – 59 % de células móviles
Mala	Menos de 40 % de células móviles



### c. Concentración espermática.

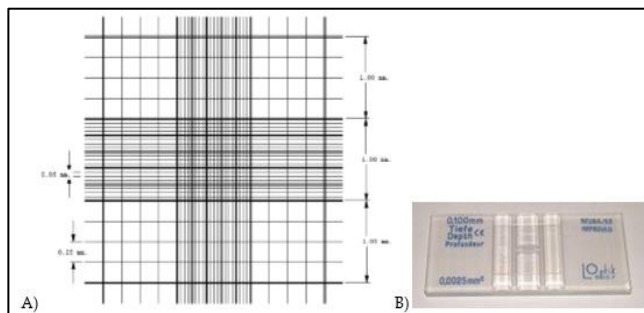
Se empleó la teoría de Prado (2012), donde se utilizó la cámara de Neubauer; primero se diluyó el semen 1:200, ya que es la correspondiente para la especie bovina. Para la dilución se utilizó NaCl- al 3%, y se realizó lo mismo en un tubo de ensayo, con capacidad de 5 mL, y se señaló con un plumón indeleble, luego se añadió 3980  $\mu\text{L}$  de NaCl- al 3% más 20  $\mu\text{L}$  de semen íntegro. Una vez diluido al semen, esto provocó que todos los espermatozoides queden inmobilizados, luego se tomó una gota de (10  $\mu\text{L}$ ) y se procedió a llenar las celdas de la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular, que consistió en enumerar la cantidad de espermatozoides que hubo en cada recuadro, en unos dos o tres campos que al final se promediaron. Se utilizó el método de Hozbor (2011), donde se evaluó la concentración espermática y se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración espermática (espermatozoides/mm}^3\text{)} = a \times b \times c \times d$$

Donde:

a= Número de espermatozoides contados en 5 cuadrados, b= 5, estima el total de cuadrantes de la cámara (n= 25 cuadros), c= 200, ya que la dilución para el semen bovino es 1:200, d= 10, representa la profundidad de la cámara, la cual es 0,1mm. Posteriormente, se multiplico por 1000 para saber la concentración de espermatozoides/mL (Mellisho, 2010).

Se contó en los 5 cuadros de la cámara para un total de 25 cuadros, en forma de X como lo indica la gráfica.



**Figura 2.** Conteo de espermatozoides en la Cámara Neubauer.

#### **d. Morfología**

Se evaluó la morfología con uso de la tinción eosina-nigrosina como tinción principal y se realizó el frotis con aceite esencial y se lavó el reverso de la platina, previamente se secó al ambiente. El frotis se observó con ayuda del microscopio de campo claro (aumento 40x), visualizándose 5 campos, en los cuales se contaron 200 espermatozoides por muestra. Se contó el número y tipo de daño, con el objeto de estimar el porcentaje (%) de espermatozoides normales. Se evaluó según la clasificación de los daños menores y daños mayores.

## 2.7 Análisis de la viabilidad por citometría de flujo.

Bollwein *et al* (2008), utilizaron pajillas crioconservadas  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  se descongelaron a  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 seg. para análisis de citometría de flujo. En unas alícuotas colocaron el semen que lo diluyeron inmediatamente después de descongelar y después 3 h de incubación a  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Utilizaron tinciones con fluorescencia verde de SYBR-14 y el Ioduro de propidio que emite una fluorescencia roja. No utilizaron ninguna compensación entre los correspondientes canales de fluorescencia.

Según Challco (2019), preparó una solución Stock de SYBR-14, para llegar a una concentración de  $20\text{ }\mu\text{M}$ . Se tomó  $100\text{ }\mu\text{L}$  de muestra. Se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, luego se agregó  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  de Solución Stock de SYBR-14 ( $20\text{ }\mu\text{M}$ ), para obtener una concentración final de  $100\text{ nM}$  de SYBR-14. Se puso a incubar durante 10 minutos a  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Adicionalmente se colocó  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  de solución Stock de Ioduro de Propidio ( $2.4\text{ nM}$ ), para llegar a una concentración final de Ioduro de Propidio de  $12\text{ }\mu\text{M}$  y se puso a incubar por 10 minutos. Se consideró espermatozoides vivos a aquellos que presenten fluorescencia verde (SYBR-14) y muertos, a aquellos que presenten fluorescencia roja (PI).

Para hacer uso del citometro de flujo se realizó los siguientes procedimientos:

### A. Evaluación del semen sin tinción de Ioduro de propidio (control).

- Se descongelo las pajuelas de cada ejemplar en un Baño María a una temperatura de  $37.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , luego se colocó la muestra de semen en un eppendorf indicando el nombre del toro, en seguida se colocó una gota de semen en un portaobjeto para ser analizada en el microscopio electrónico para verificar la motilidad.
- Se agregó  $1000\text{ }\mu\text{l}$  de PBS a la muestra de semen, en seguida se llevo a la centrifuga a  $1500\text{ rpm}$  por 3 minutos. Después, se sacó la muestra de la centrifuga y en otro eppendorf se colocó  $10\text{ }\mu\text{l}$  del semen suspendido para evaluar en el citometro de flujo.

- Después, se colocó el eppendorf con el semen sin tinción en el tubo de inyección del citometro de flujo, luego en el equipo se seleccionó una cantidad de 100  $\mu$ l y automáticamente subió la muestra para su análisis, se presionó comenzar y el semen empezó a pasar una por una mostrándose en los canales de visualización del equipo.
- Luego se colocó en la barra para tener 10,000 eventos celulares de las muestras con semen de J-TRM y V-TRM sin tinción PI respectivamente.
- Se finalizó guardando la información de la evaluación del semen en una carpeta en el equipo para su posterior interpretación.

#### **B. Evaluación del semen con tinción de Ioduro de propidio.**

- Se descongelo las pajuelas de cada ejemplar en un Baño María a una temperatura de 37.5 C°, luego se colocó la muestra de semen en un eppendorf indicando el nombre del toro, en seguida se colocó una gota de semen en un portaobjeto para ser analizada en el microscopio electrónico para ver su motilidad post descongelación.
- Luego, se agregó 1000  $\mu$ l de PBS a la muestra de semen, en seguida se llevó a la centrifuga a 1500 rpm por 3 minutos. Después, se sacó la muestra de la centrifuga y en otro eppendorf se colocó 10  $\mu$ l del semen suspendido y en seguida se colocó 100  $\mu$ l del colorante diluido.
- Después, se colocó el eppendorf del semen con la tinción de Ioduro de propidio combinados en el tubo de inyección del citometro de flujo, luego en el equipo se seleccionó una cantidad de 100  $\mu$ l y automáticamente subió la muestra para su análisis, en seguida se presionó comenzar y el semen empezó a pasar una por una mostrándose en los canales de visualización del equipo. Se colocó en la barra para tener 10,000 eventos celulares con semen de J-TRM y V-TRM con tinción PI respectivamente y se analizó en el citometro de flujo con el láser de Argon a 488 nm de excitación, con la evaluación de 1000 esp/seg. Las células muertas tienen un espectro de emisión y son detectadas por medio de los fotomultiplicadores en modo logarítmico como lo evaluado por Cortés *et al* (2014).
- Finalmente, se guardó la información de la evaluación del semen en una carpeta en el equipo para su posterior interpretación.

### **C. Interpretación de graficas sin tinción de Ioduro de propidio.**

Para la muestra control sin tinción de Ioduro de propidio, se seleccionó los análisis guardados del resultado de las muestras sin PI, luego se comparó cada grafica tanto de J-TRM como de V-TRM. Se seleccionó el único pico que se mostraba en la gráfica del histograma, finalmente, el equipo mostro los resultados del pico seleccionado el cual representaba al porcentaje de espermatozoides sin fluorescencia natural, por el contrario la diferencia representaba a la fluorescencia natural emitida por los espermatozoides obtenidos con el citometro de flujo.

### **D. Interpretación de graficas con tinción de Ioduro de propidio.**

Para la interpretación de la viabilidad se procedió comparando cada grafica obtenida tanto de J-TRM como de V-TRM que había sido teñido con el Ioduro de propidio. Para esto se seleccionó las zonas de los histogramas donde el pico derecho representaba la reacción del fluorocromo a los espermatozoides muertos los cuales fueron teñidos de color rojo por la penetración del PI y el pico del lado izquierdo para el reconocimiento de los espermatozoides vivos. Finalmente, el equipo mostró los resultados de cada pico seleccionado con el porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides muertos obteniendo la viabilidad de cada ejemplar.

Para el apagado del equipo, se pasaba a realizar el procedimiento de lavado que fue al final del trabajo, por el periodo de 30 minutos.

### III. RESULTADOS.

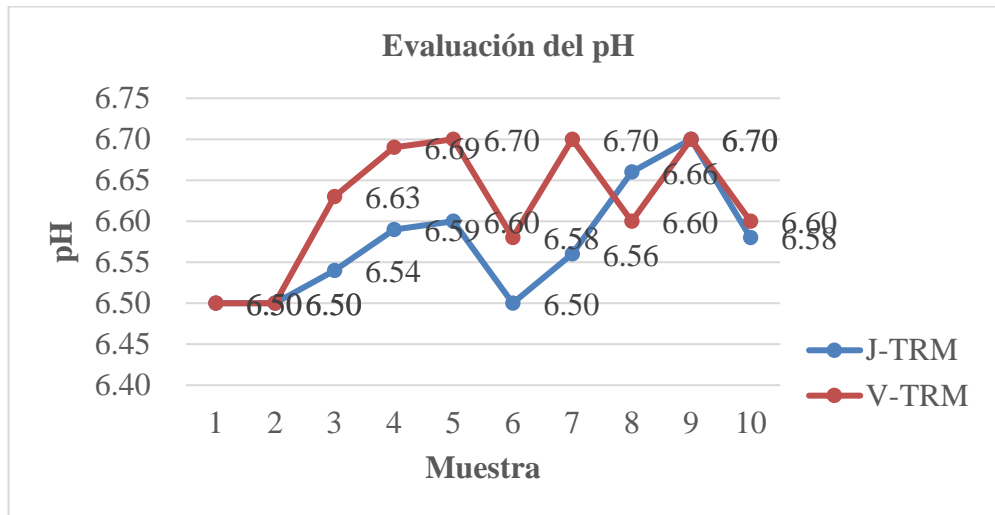
Los resultados de los datos obtenidos de las características macroscópicas, microscópicas y por citometría de flujo se muestran en el siguiente cuadro:

**Tabla 4:** Resultados de las estadísticas de grupo.

Variable	Tipo de toro	N	Media	Desv. Estandar	Desv. Error promedio
Volumen	J-TRM	10	6.49	0.8698	0.2751
	V-TRM	10	6.08	0.8817	0.2788
Morfología	J-TRM	10	14.15	2.321	0.134
	V-TRM	10	15.4	2.171	0.686
Concentración	J-TRM	10	1040	146.818	46.428
	V-TRM	10	1073	84.728	26.793
Vivos	J-TRM	10	43.19	9.929	3.140
	V-TRM	10	47.16	9.682	3.062
Muertos	J-TRM	10	56.89	10.268	3.247
	V-TRM	10	52.702	9.758	3.086
No Fluorescencia	J-TRM	10	96.18	0.933	0.295
	V-TRM	10	96.45	1.414	0.447
Fluorescencia natural	J-TRM	10	0.034	0.011	0.003
	V-TRM	10	0.033	0.014	0.004

#### a. Ph.

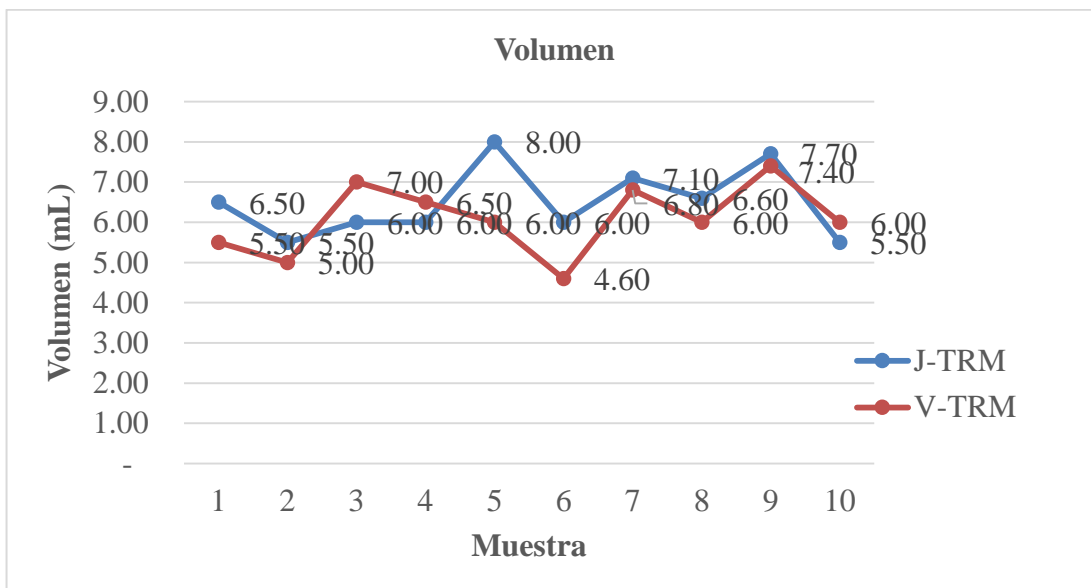
En el pH se mostro que los promedios encontrados en el resultado estadístico del toro J-TRM y V-TRM fueron 6.57 y 6.62 respectivamente, donde numéricamente existió una diferencia del 0.05 pero sin existencia de una diferencia significativa estadísticamente.



**Figura 3.** Resultados del pH.

**b. Volumen.**

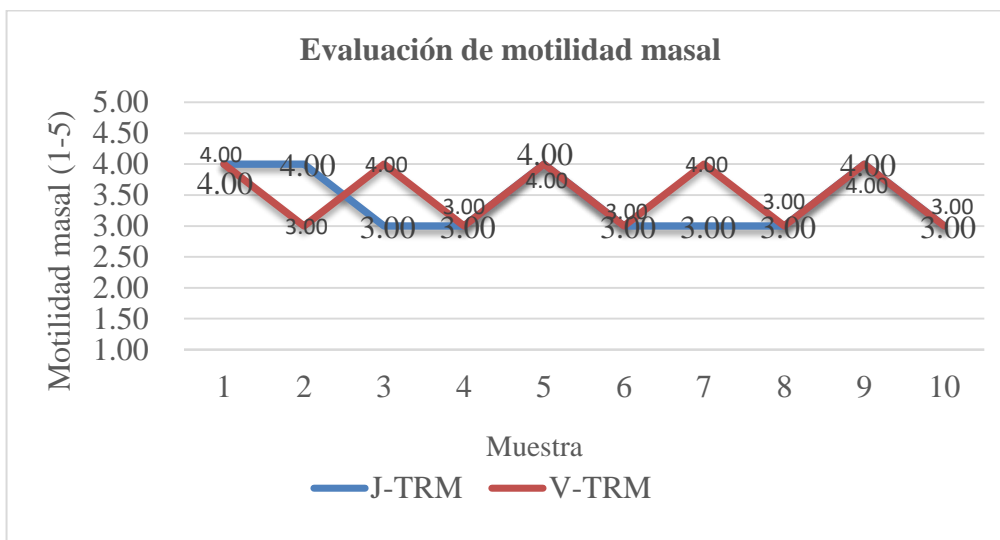
En el volumen se obtuvo un  $6.49 \pm 0.87$  del toro J-TRM y  $6.08 \pm 0.87$  del toro V-TRM sin encontrar ninguna diferencia significativa.



**Figura 4.** Volumen de J-TRM y V-TRM.

**c. Motilidad masal.**

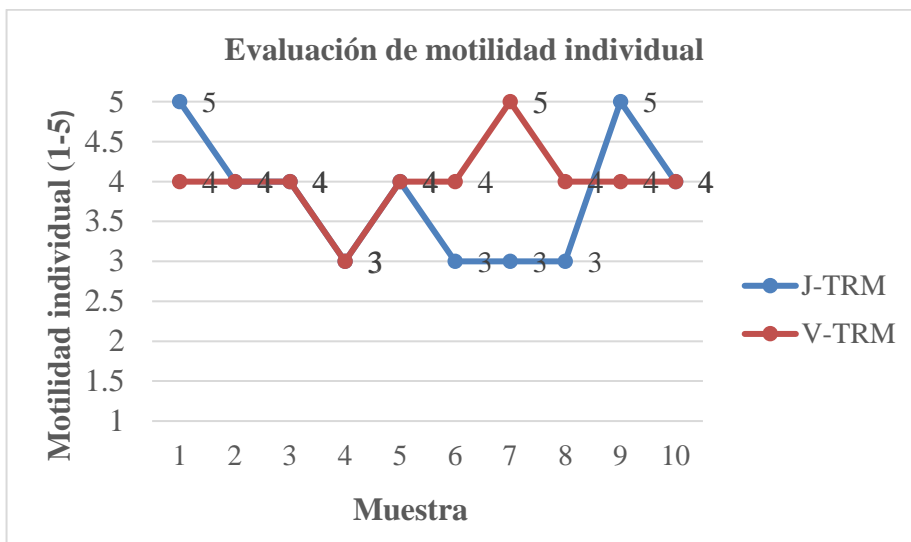
En la motilidad masal se evidenció que no existió diferencia estadística significativa en 3.4 y 3.5 tanto para J-TRM y V-TRM; respectivamente.



**Figura 5.** Motilidad masal de J-TRM y V-TRM.

d. **Motilidad individual.**

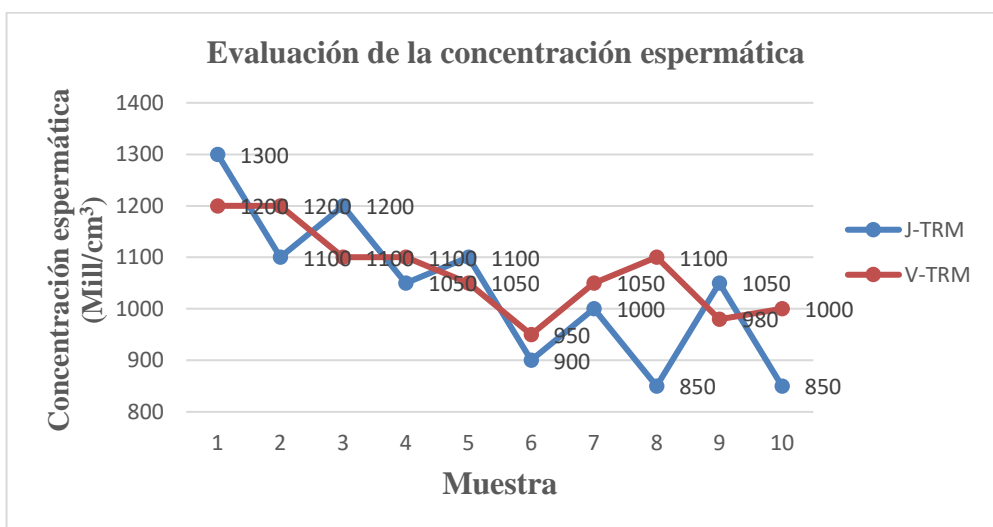
En la motilidad individual tampoco se encontró diferencias significativas con resultados de 3.8 para J-TRM y 4.0 para V-TRM, representando el 76% y 80%; respectivamente.



**Figura 6.** Motilidad individual de J-TRM y V-TRM.

e. **Concentración espermática.**

La concentración espermática para J-TRM fue  $1040 \times 10^6 \pm 146.82$  y para V-TRM fue  $1073 \times 10^6 \pm 84.73$ , sin diferencias estadística significativa.

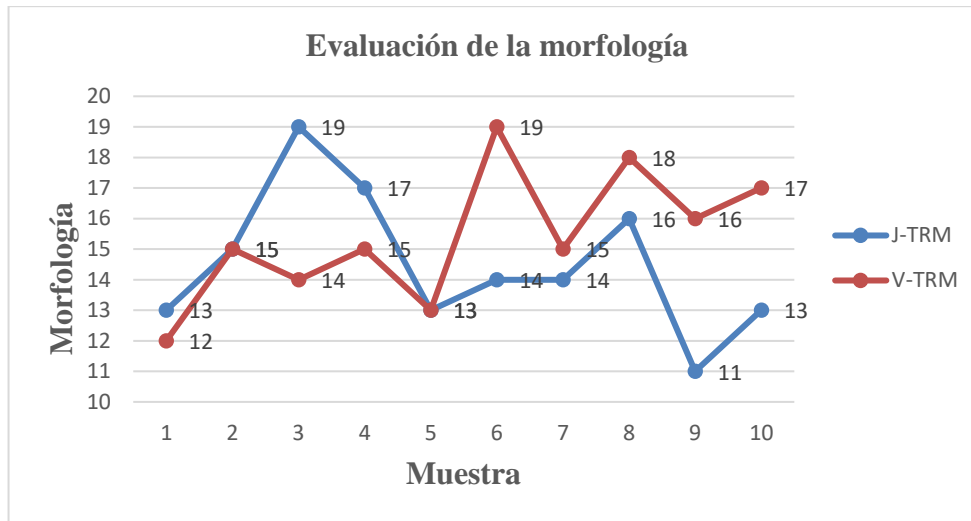


**Figura 7.** Resultados de concentración.



**f. Morfología espermática.**

En la morfología los resultados de la evaluación mediante determinación de los daños menores y mayores. Para el toro J-TRM fue un 14.5% en promedio y para V-TRM el 15.4% del total de alteraciones morfológicas, sin encontrar diferencias significativas entre los valores.

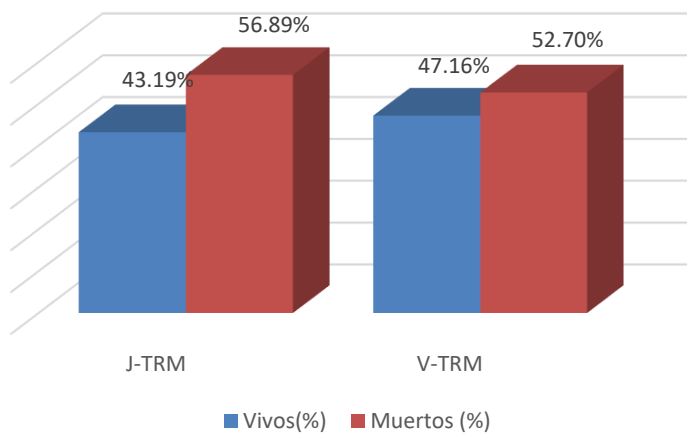


**Figura 8.** Resultados de morfología.

### g. Viabilidad

En la fluorescencia natural emitida por los espermatozoides, se obtuvo valores de  $0.034 \pm 0.011$  para el toro J-TRM y  $0.033 \pm 0.014$  para el toro V-TRM. Sin encontrar ninguna diferencia estadística significativa.

La viabilidad para J-TRM fue de  $43.19 \pm 9.93\%$  de espermatozoides vivos y  $56.89 \pm 10.27\%$  de espermatozoides muertos, respectivamente. Para V-TRM fue de  $47.16 \pm 9.68\%$  de espermatozoides vivos y  $52.70 \pm 9.76\%$  de espermatozoides muertos, en combinación de la tinción PI utilizados en ambos casos, sin presentar diferencias significativas entre los clones ( $P < 0,05$ ).



**Figura 9.** Viabilidad espermática de J-TRM y V-TRM con PI.

### 3.1 Detalle del resultado de las características macroscópicas y microscópicas.

**Tabla 5:** *Resumen de datos macroscópicas y microscópicas del toro J-TRM*

Tipo	Tipo	Ph	Volumen	Motilidad Masal	Motilidad Individual	Morfología	Concentración x 106
J-TRM	1	6.50	6.50	4.00	5	13	1300
J-TRM	1	6.50	5.50	4.00	4	15	1100
J-TRM	1	6.54	6.00	3.00	4	19	1200
J-TRM	1	6.59	6.00	3.00	3	17	1050
J-TRM	1	6.60	8.00	4.00	4	13	1100
J-TRM	1	6.50	6.00	3.00	3	14	900
J-TRM	1	6.56	7.10	3.00	3	14	1000
J-TRM	1	6.66	6.60	3.00	3	16	850
J-TRM	1	6.70	7.70	4.00	5	11	1050
J-TRM	1	6.58	5.50	3.00	4	13	850
PROMEDIO		6.57	6.49	3.40	3.8	14.50	1040

**Tabla 6:** *Resumen de datos macroscópicas y microscópicas del toro V-TRM.*

Tipo	Tipo	Ph	Volumen	Motilidad Masal	Motilidad Individual	Morfología	Concentración x 106
V-TRM	2	6.50	5.50	4.00	4	12	1200
V-TRM	2	6.50	5.00	3.00	4	15	1200
V-TRM	2	6.63	7.00	4.00	4	14	1100
V-TRM	2	6.69	6.50	3.00	3	15	1100
V-TRM	2	6.70	6.00	4.00	4	13	1050
V-TRM	2	6.58	4.60	3.00	4	19	950
V-TRM	2	6.70	6.80	4.00	5	15	1050
V-TRM	2	6.60	6.00	3.00	4	18	1100
V-TRM	2	6.70	7.40	4.00	4	16	980
V-TRM	2	6.60	6.00	3.00	4	17	1000
PROMEDIO		6.62	6.08	3.50	4	15.4	1073

En la tabla 5 y 6 se muestran los datos de las variables estudiadas respecto a características macroscópicas y microscópicas, mostrándose promedios entre cada variable de los toros J-TRM y V-TRM las cuales fueron tomadas de 10 pruebas por cada ejemplar.

### 3.2 Detalle del resultado de viabilidad y fluorescencia natural.

**Tabla 7:** Datos de J-TRM obtenidos por el citometro de flujo.

<b>Toro</b>	<b>Tipo de toro</b>	<b>Vivos (%)</b>	<b>Muertos (%)</b>	<b>No Fluorescencia (%)</b>	<b>Fluorescencia natural (%)</b>
J-TRM	1	38.3	61.6	96.2	0.03
J-TRM	1	41.7	58.2	94.8	0.05
J-TRM	1	59.7	40.2	98.2	0.01
J-TRM	1	41.9	57.8	95.6	0.04
J-TRM	1	28.6	73.3	96.1	0.03
J-TRM	1	51.6	48.3	96.9	0.03
J-TRM	1	40.2	59.7	95.4	0.04
J-TRM	1	57.3	42.6	96.7	0.03
J-TRM	1	36.7	63.2	95.9	0.04
J-TRM	1	35.9	64	96	0.04
<b>Promedio</b>		43.19	56.89	96.18	0.034

**Tabla 8:** Datos de V-TRM obtenidos del citometro de flujo.

<b>Toro</b>	<b>Tipo de toro</b>	<b>Vivos (%)</b>	<b>Muertos (%)</b>	<b>No Fluorescencia (%)</b>	<b>Fluorescencia natural (%)</b>
V-TRM	2	58.8	40.6	96	0.04
V-TRM	2	59.6	40.3	98.6	0.01
V-TRM	2	44.2	55.7	96	0.04
V-TRM	2	40.4	59.5	96.1	0.03
V-TRM	2	49.8	50.1	95.4	0.04
V-TRM	2	51.6	48.3	93.8	0.06
V-TRM	2	49.3	50.6	98	0.02
V-TRM	2	49.8	50.1	97.8	0.02
V-TRM	2	41.7	58.32	96.9	0.03
V-TRM	2	26.4	73.5	95.9	0.04
<b>Promedio</b>		47.16	42.49	96.45	0.033

#### IV. DISCUSIONES

Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético. (Hidalgo-Ordoñez *et al.*, 2005)

##### a) pH.

Según, Ax *et al* (2000), los rangos de pH en semen de toros sanos están entre 6 – 8, en la presente investigación los toros J-TRM (pH: 6.57) y V-TRM (pH: 6.62) presentaron un pH seminal que están dentro del rango óptimo para bovinos.

##### b) Volumen.

Aquino (2017), evaluó 9 toros de razas cárnicas dentro de ellas a dos Aberdeen Angus con edades entre 30 y 60 meses, manejados bajo un sistema de confinamiento en corrales individuales, obteniéndose 5.9 ml de volumen de eyaculado en promedio, existiendo diferencias con los resultados de la presente investigación; donde se encontró volúmenes de  $6.49 \pm 0.87$  (J-TRM) y  $6.08 \pm 0.87$  (V-TRM), a diferencia que estos ejemplares fueron criados en sistemas de pastoreo extensivo y con condiciones ambientales favorables. Según Ax *et al* (2000), el volumen de semen en bovinos tiene un amplio rango que va de 2-6ml.

##### c) Motilidad masal.

Mellisho (2010), menciona que la motilidad masal se determina con semen fresco, donde Crespo y Quintero-Moreno (2014), evaluaron semen fresco en toros Criollos Limoneros, en el que colectaron muestras seminales de 10 toros durante cuatro semanas (40 muestras) mediante vagina artificial, los cuales tenían una edad promedio de  $41,4 \pm 1,04$  meses, donde los valores observados de motilidad masal fue de  $3,2 \pm 0,08$ . Estos resultados difieren a los encontrados en esta investigación, donde la evaluación de la motilidad masal de toros de la raza Aberdeen Angus de 2.5 años presentaron valores de 3.4 (J-TRM) y 3.5 (V-TRM) respectivamente, lo cual podría deberse a que son de razas diferentes, al sitio de crianza, a factores ambientales entre otros.

**d) Motilidad individual.**

Según Buito *et al* (2002), estudiaron semen congelado de 68 toros B. Indicus, 34 B. Taurus (considerando toros Aberdeen Angus) y 5 Cruces con edades en promedio de  $69.8 \pm 31.8$  meses (rango: 18 a 184 meses), obteniendo una motilidad individual en promedio de  $59.3 \pm 0.8\%$  para B. Indicus,  $58.9 \pm 1.0\%$  para B. Taurus y  $60.4 \pm 1.7\%$  para los cruces. Sin embargo, los resultados de la motilidad individual en esta investigación (semen fresco de Angus con edades de 2.5 años) fueron mayores con 76% (J-TRM) y 80% (V-TRM), encontrándose entre los rangos para las edades y difieren debido a que Buito *et al* evaluaron semen congelado.

**e) Concentración espermática**

En la evaluación de la concentración espermática se obtuvieron  $1040 \times 10^6 \pm 146.82$  (J-TRM) y  $1073 \times 10^6 \pm 84.73$  (V-TRM), estos resultados difieren frente a lo encontrado por Koivisto *et al* (2009), donde la concentración media de esperma varió entre 1423.8 y  $1613.8 \times 10^6$ /ml en los toros B. Indicus y entre 1190.9 a  $1306.6 \times 10^6$ /ml en toros B. Taurus y fue significativamente mayor en los toros B. Indicus. Sin embargo, Escobedo (2016), con toros Aberdeen Angus criados en sistemas semi estabulados con edades de 2 y 3 años, colectados mediante vagina artificial, obtuvo concentraciones de 883.0 y 838.9 millones de espermatozoides/ml en Angus y Charolais, respectivamente, donde difirieron entre edades, siendo 915.7 millones de espermatozoides/ml en los de 3 años y 806.2 millones de espermatozoides/ml en los de 2 años. Asimismo, los resultados están dentro del rango de B. Taurus, pero difieren de los de Escobedo, el cual estudió toros Angus y donde los promedios encontrados en esta investigación son superiores para la raza.

**f) Morfología.**

Muiño (2008), presento un porcentaje de 15.9% de anomalías morfológicamente estudiadas en bovinos, en la presente investigación los resultados de anomalías fueron  $14.50 \pm 2.32\%$  (J-TRM) y  $15.40 \pm 2.17\%$  (V-TRM), encontrándose dentro de los parámetros establecidos para una buena fertilidad en bovinos. Esto es corroborado por Ax *et al* (2000), quien recomienda que el número de formas anormales primarias puede alcanzar el 10% sin exceder un 20%.

**g) Viabilidad.**

Bollwein *et al* (2008), utilizaron espermatozoides criopreservados de 20 toros Simmental y Pardo Suizo con 4 eyaculados cada uno, con una edad media de  $3.1 \pm 2.4$  años (rango: 1-8 años), donde, se examinó mediante citometría de flujo con semen bovinos criopreservados. El cual utilizó SYBR14 (para determinar el porcentaje de membranas plasmáticas intactas en el espermatozoides) y Ioduro de propidio (para defecto de las membranas plasmáticas) obteniendo un rango de porcentajes de espermatozoides con membrana plasmática intacta de  $37.4\% \pm 6.8\%$  y con una membrana con defecto de  $56.8\% \pm 8.0\%$  respectivamente. Los resultados difieren a los obtenidos en esta investigación donde se usó el mismo fluorocromo de tinción el (PI) para identificar espermatozoides muertos y con porcentajes de  $56.89 \pm 10.27\%$  de espermatozoides muertos para (J-TRM) y  $52.70 \pm 9.76\%$  de espermatozoides muertos para (V-TRM), lo cual estas variaciones podrían estar influenciados por diversos factores como: congelación, postdescongelación, clima, sanidad, etc.

## V. CONCLUSIONES

Los procesos mediante bipartición embrionaria en bovinos, no alteran los resultados de las características seminales estudiadas en estos clones, donde se obtuvo resultados óptimos, sin embargo, si difieren numéricamente entre ellos, a pesar de poseer la misma carga genética, tal como afirma la epigenética que poseen la misma secuencia de ADN, mostrándose diferencias expresadas en el fenotipo, circunferencia escrotal, ganancia de peso.

Se obtuvo mejores resultados numéricamente a favor del toro V-TRM, prediciéndose que este ejemplar presentó mejores características de fertilidad: en motilidad masal (3.5), motilidad individual (80%), concentración espermática ( $1073 \times 10^6 \pm 84.73$ ) y una viabilidad ( $47.16 \pm 9.68\%$ ).

En la fluorescencia natural (control), los espermatozoides sin tinción de Ioduro de propidio no alteraron a los resultados de la viabilidad con PI, siendo un  $96.18 \pm 0.93\%$  (J-TRM) y  $96.45 \pm 1.41\%$  (V-TRM), donde no existió una excitación significativa de los espermatozoides mediante la citometría de flujo.

La evaluación de viabilidad mediante citometría de flujo presentó una diferencia numérica de 3.97% a favor del toro V-TRM, sin encontrar diferencias significativas entre clones ( $P < 0,05$ ).

En conclusión se demostró que ambos clones poseen características seminales parecidas y que son óptimas para ser probadas en las técnicas de reproducción (I.A, MOET, FIV), cumpliéndose con los parámetros esperados para bovinos.



## **VI. RECOMENDACIONES**

Evitar que el semen tome contacto con agua ya que puede dañar las muestras, además se debe evitar también el sobre enfriamiento o calentamiento del semen debido a que va ver un estrés térmico que puede producir daños en el semen.

Realizar futuras investigaciones de fertilización con clones mediante programas de mejoramiento genético como Inseminación Artificial, FIV, MOET para probar su capacidad fecundante, ya que ambos clones presentaron características seminales óptimas, para ver cuál de los toros responde mejor a dichas técnicas.

Se recomienda el apoyo de un profesional especializado en el manejo y análisis de las gráficas del citometro de flujo.

## VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Ax, R., Dally, M., Didion, B., Lenz, R., Love, C., Varner, D., Bellin, M. (2000). *Evaluación del Semen*. México: McGraw-Hill.
- Aquino Dávalos M. A.(2017). Características seminales en toros de razas cárnicas y doble propósito. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Bollwein, H., Funchs, I., Koess, C., (2008). Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 43, 189–195. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00876.x ISSN 0936-6768.
- Brito L.F.C., Silva A.E.D.F., Rodrigues L.H., Vieira F.V., Deragon L.A.G., Kastelic J.P. (2002). Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*. 58 (1175-1186). doi: 10.1016/s0093-691x(02)00921-4.
- Cabrera V. Próspero y Pantoja A. César. (2012, abril-junio). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, RIVEP*, vol. 23, núm. 2, pp. 192-200.
- Cano Torres, R., y Felipe Pérez, Y. E. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de reproducción aplicada. *Manual de Prácticas de Laboratorio*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Subdirección Académica. Área de Docencia de Producción Animal, México.
- Chalco Salas, C. Y. (2019). Caracterización básica y funcional del semen del perro sin pelo del Perú. (Tesis de pregrado). Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.
- Cortés B. E., Cervantes R. E. y Ortiz M. A. R. (2014). Manual de Prácticas de Laboratorio. *Manual de Prácticas de Laboratorio: Citometría de Flujo*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. *I edic*. México, D. F. I, 39-43.

- Dobriniski, I., Hughes, H. P. A and Barth, A. D. (1994). Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *Journal of reproduction and fertility*. Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan; and Veterinary Infectious *Disease Organization*, Saskatoon, SK, Canada, S7N OWO. 101. 531-538.
- Escobedo H., H. (2016). Principales características seminales en vacunos de carne del Cip Chuquibambilla. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú.
- González Ramírez, A., Díaz Martínez, A., y Díaz Anzaldúa, A. (2008). La epigenética y los estudios en gemelos en el campo de la psiquiatría. *Salud Mental Vol. 31*. Departamento de Genética, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente., México.
- Gliozzi, T. M., Turri, F., Manes, S., Cassinelli, C. and Pizzi, F. (2017). The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, National Research Council, Lodi, Italy. *Animal* , page 1 of 8. *The Animal Consortium*. doi:10.1017/S1751731117000684.
- Hidalgo-Ordóñez, C.O., C.M. Tamargo, y C.M. Díez. (2005). Análisis del semen bovino. Revista Tecnología Agroalimentaria. *Boletín informativo número. 2*. Asturias, España.
- Koivisto, M. B., Costa, M. T. A., Perri, S. H. V., Vicente, W. R. R. (2008). The Effect of Season on Semen Characteristics and Freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* Bulls in the Southeastern Region of Brazil. *Reprod Dom Anim* 44, 587–592.
- Laguado José. (2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. *Rev. MVZ Córdoba* 12 (2): 1077-1095.
- Mellisho, E. (2010). Evaluación seminal de calidad seminal. *Manual de Laboratorio de Reproducción Animal*, 7.

- Muiño Otero, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen Bovino mediante el uso de sistemas CASA y Citometría de flujo.
- Neissa J. y Guerrero C. (2004). Del código genético al código epigenético: nuevas estrategias terapéuticas. *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Colomb*; 52(4):395-401.
- Prado, A. H. (2012). Evaluación de las Características Seminales de Sementales Bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA). *Postgrado en reproducción animal y tecnología de la inseminación artificial*, 38-40.
- Sharoare H.M., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Pimenta S.A. y Rodríguez-Martínez, H. (2011). Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian Journal of Andrology* P. 13, 406–419. doi:10.1038/aja.2011.15
- Uhler M.L., Leung A., Chan S.Y.W., Schmid I., Wang, C. (1993). Assessment of human sperm acrosome reaction by flow cytometry: validation and evaluation of the method by fluorescence activated cell sorting. *Fertil Steril*; 60:1076–81.

## VIII. ANEXO

### Anexo 01: Resultados estadísticos de cada prueba.

**Tabla 9:** Datos de cada variable estudiada.

<b>Características macroscópicas</b>	<b>J-TRM</b>	<b>V-TRM</b>
pH	6.57	6.62
Volumen	6.49±0.87	6.08±0.87
<b>Características microscópicas</b>	<b>J-TRM</b>	<b>V-TRM</b>
Motilidad masal	3.4	3.5
Motilidad individual	3.8	4.0
Concentración espermática	1040±146.82	1073±84.73
Morfología	14.50±2.32	15.40±2.17
<b>Características de viabilidad por citometría de flujo</b>	<b>J-TRM</b>	<b>V-TRM</b>
Vivos (%)	43.19±9.93	47.16±9.68
Muertos (%)	56.89±10.27	52.70±9.76
<b>Características de fluorescencia natural</b>	<b>J-TRM</b>	<b>V-TRM</b>
No fluorescencia (%)	96.18±0.93	96.45±1.41
Fluorescencia natural (%)	0.034±0.011	0.033±0.014

**Tabla 10:** Pruebas de normalidad de las características macro y microscópicas

Tipo		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Ph	J-TRM	0.157	10	,200	0.912	10	0.296
	V-TRM	0.423	10	0.000	0.563	10	0.000
Volumen	J-TRM	0.213	10	,200	0.909	10	0.273
	V-TRM	0.164	10	,200	0.970	10	0.886
Motilidad Masal	J-TRM	0.381	10	0.000	0.640	10	0.000
	V-TRM	0.329	10	0.003	0.655	10	0.000
Motilidad Individual	J-TRM	0.245	10	0.091	0.820	10	0.025
	V-TRM	0.400	10	0.000	0.658	10	0.000
Morfología	J-TRM	0.185	10	,200	0.952	10	0.690
	V-TRM	0.173	10	,200	0.974	10	0.926
Concentración	J-TRM	0.141	10	,200	0.946	10	0.625
	V-TRM	0.175	10	,200	0.932	10	0.467

**Tabla 11:** Pruebas de normalidad de viabilidad y fluorescencia natural.

Variable	Tipo de toro	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
Vivos	J-TRM	0.920	10	0.361
	V-TRM	0.925	10	0.397
Muertos	J-TRM	0.933	10	0.476
	V-TRM	0.923	10	0.381
No Fluorescencia	J-TRM	0.945	10	0.606
	V-TRM	0.948	10	0.642
Fluorescencia natural	J-TRM	0.866	10	0.090
	V-TRM	0.937	10	0.520

**Tabla 12:** Estadísticos de prueba

	Ph	Motilidad Masal	Motilidad Individual
U de Mann-Whitney	30.500	45.000	41.000
W de Wilcoxon	85.500	100.000	96.000
Z	-1.490	-0.438	-0.777
Sig. asintótica(bilateral)	0.136	0.661	0.437
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,143	,739	,529

En la tabla 12 se observa que para todas las variables la sig>0.05, lo que se concluye que no existe diferencia significativa en relación a las variables respecto al tipo de toro, a un nivel de confianza del 95%.

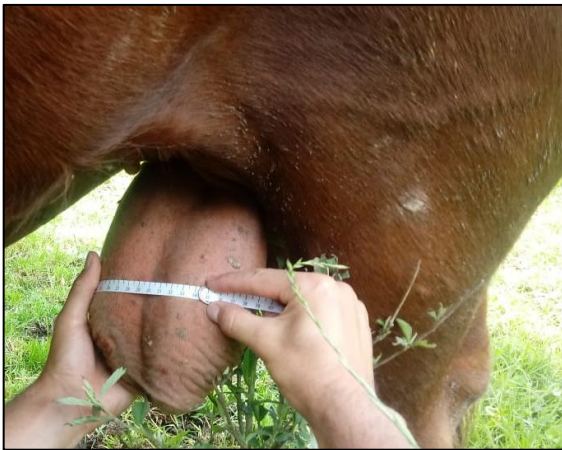
**Tabla 13: Pruebas de muestras independientes.**

	Prueba de Levene			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		
								Inferior	Superior	
Volumen	0.004	0.951	1.047	18	0.309	0.4100	0.3916	-0.4128	1.2328	
			1.047	17.997	0.309	0.4100	0.3916	-0.4128	1.2328	
Morfología	0.043	0.838	-0.896	18	0.382	-0.900	1.005	-3.011	1.211	
			-0.896	17.919	0.382	-0.900	1.005	-3.012	1.212	
Concentración	2.064	0.168	-0.616	18	0.546	-33.000	53.605	-145.619	79.619	
			-0.616	14.396	0.548	-33.000	53.605	-147.674	81.674	
Vivos	0.057	0.814	-0.905	18	0.377	-3.9700	4.3856	-13.1837	5.2437	
			-0.905	17.989	0.377	-3.9700	4.3856	-13.1842	5.2442	
Muertos	0.062	0.806	0.935	18	0.362	4.1880	4.4793	-5.2226	13.5986	
			0.935	17.953	0.362	4.1880	4.4793	-5.2244	13.6004	
No Fluorescencia	1.880	0.187	-0.504	18	0.620	-0.2700	0.5358	-1.3958	0.8558	
			-0.504	15.586	0.621	-0.2700	0.5358	-1.4084	0.8684	
Fluorescencia natural	0.810	0.380	0.178	18	0.861	0.0010	0.0056	-0.0108	0.0128	
			0.178	16.775	0.861	0.0010	0.0056	-0.0109	0.0129	

**Anexo 02: Panel fotográfico.**



**Figura 10.** Preparación del clones para la colecta de semen.



**Figura 11.** Circunferencia escrotal de J-TRM.



**Figura 12.** Circunferencia escrotal de V-TRM.





**Figura 13.** Estimulación del toro.



**Figura 14.** Colecta del semen.



**Figura 15.** Semen colectado.



**Figura 16.** Identificación de la muestra.



*Figura 17.* Traslado del semen al laboratorio.



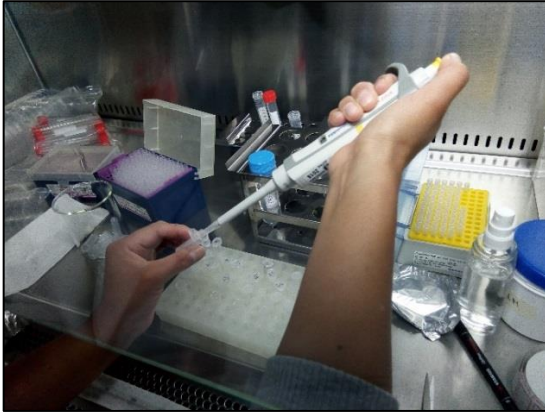
*Figura 18.* Criopreservación del semen.



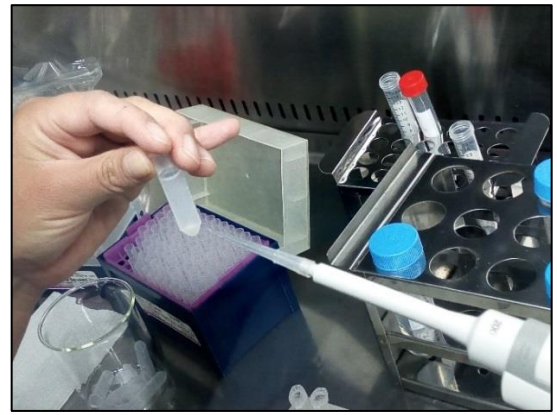
*Figura 19.* Evaluación del semen de V-TRM.



*Figura 20.* Evaluación de la morfología.



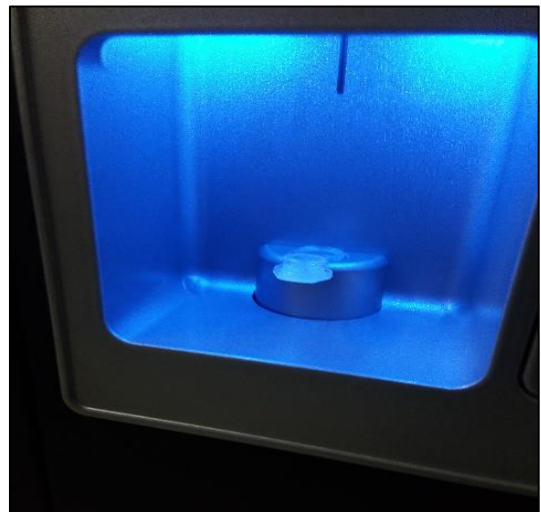
**Figura 21.** Evaluación de la viabilidad.



**Figura 22.** Lavado de la muestra.



**Figura 23.** Centrifugación del semen.



**Figura 24.** Muestra colocada al citometro de flujo.

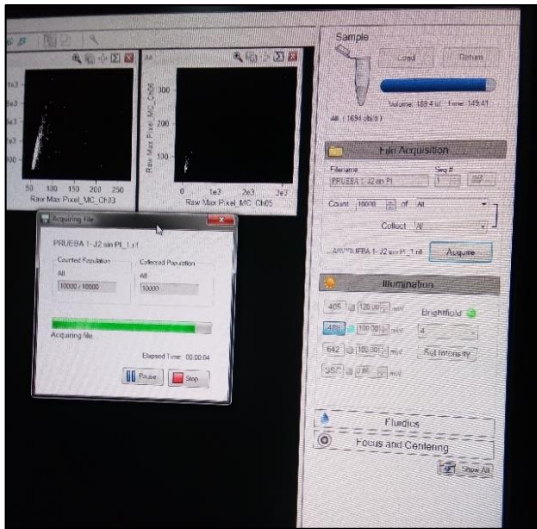


Figura 25. Eventualidad del analisis.

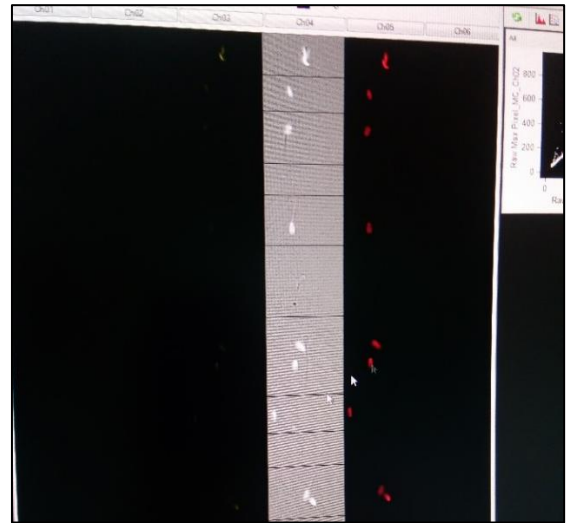


Figura 26. Sistema de análisis con canales de visualización.

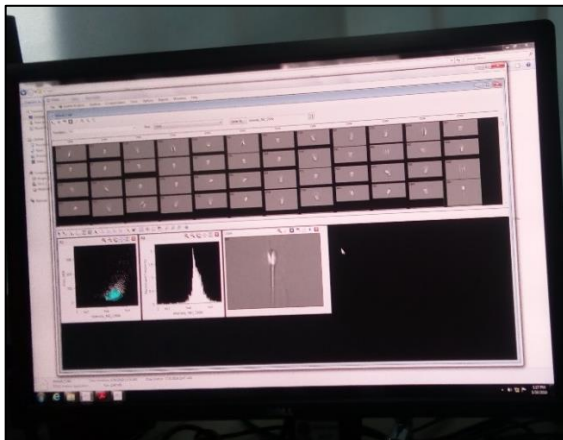


Figura 27. Formación de graficas e histogramas.

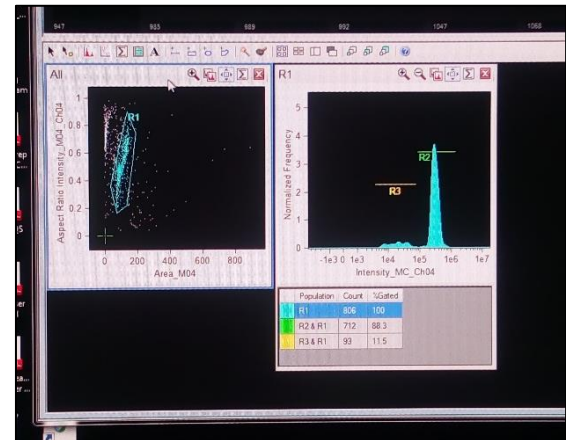
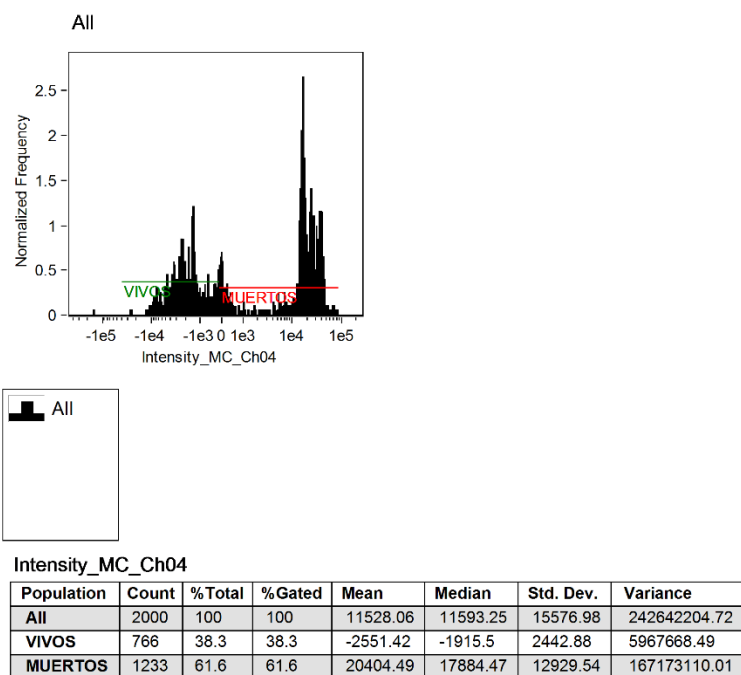
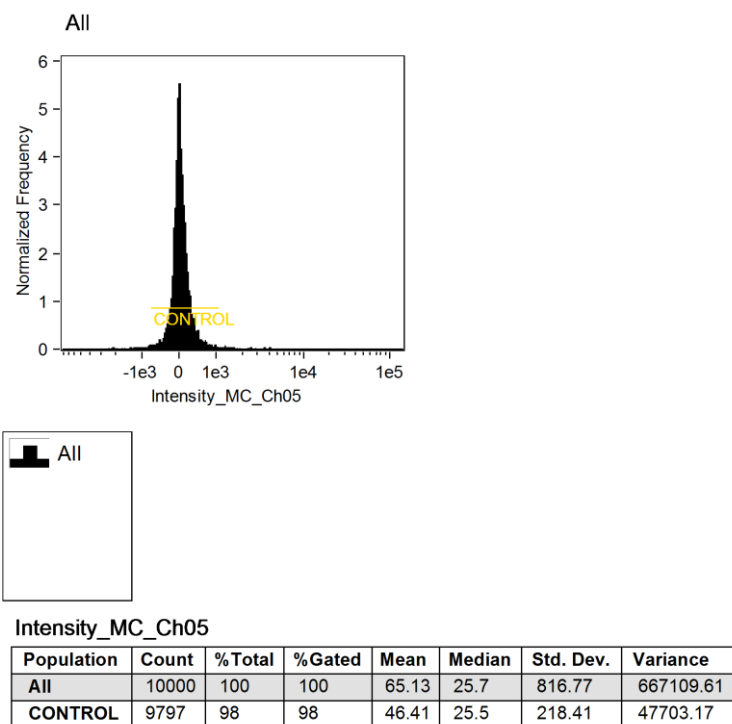


Figura 28. Comparación de niveles.

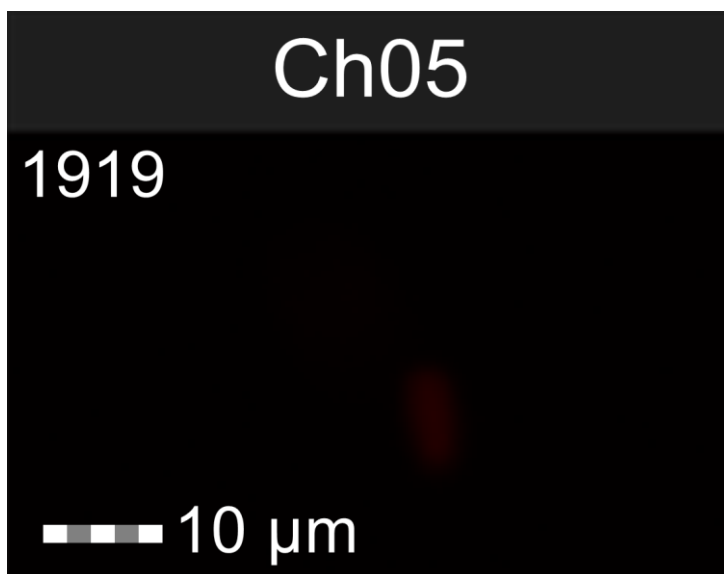
**Anexo 03:** Graficas de los resultados mediante la citometría de flujo.



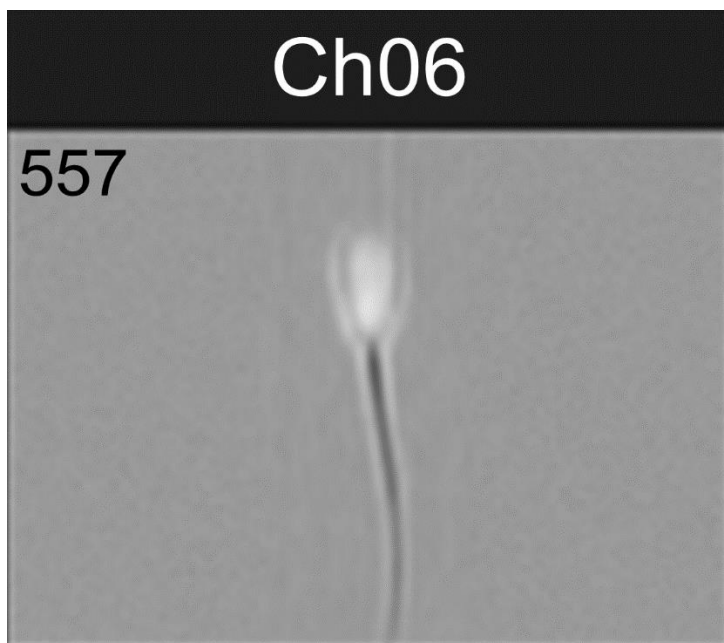
**Figura 29.** Resultado de viabilidad de J-TRM.



**Figura 30.** Resultado de fluorescencia natural de los espermatozoides.



*Figura 31.* Tamaño del espermatozoide.



*Figura 32.* Visualización del espermatozoide.