

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
VETERINARIAS**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

TESIS:

**CALIDAD ESPERMÁTICA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS
REPRODUCTORES DE CAJAMARCA EVALUADOS POR
MICROSCOPIA Y CITOMETRÍA DE FLUJO**

Para optar el Grado Académico de

DOCTOR EN CIENCIAS

MENCIÓN: CIENCIAS VETERINARIAS

Presentado por:

MSc. JOSÉ ELÍAS RAFAEL BAUTISTA

Asesor:

Dr. CORPUS HILDEBRANDO CERNA CABRERA

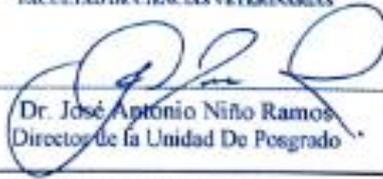
Cajamarca, Perú

2024

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: M. Cs. JOSÉ ELÍAS RAFAEL BAUTISTA
DNI: 41412771
Escuela Profesional/Unidad UNC:
UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
2. Asesor:
Dr. CORPUS HILDEBRANDO CERNA CABRERA
3. Grado académico o título profesional
 Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor
4. Tipo de Investigación:
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación: "CALIDAD ESPERMÁTICA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS REPRODUCTORES DE CAJAMARCA, EVALUADOS POR MICROSCOPIA Y CITOMETRÍA DE FLUJO"
6. Fecha de evaluación: Viernes, 21 de Marzo de 2024
7. Software antiplagio: TURNITIN URKUND (OURIGINAL) (*)
8. Porcentaje de Informe de Similitud: 10%
9. Código Documento: old: 3117:341496449
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
 APROBADO PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Fecha Emisión: Viernes, 22 de Marzo de 2024

<i>Firma y/o Sello Emisor Constancia</i>	
	UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
	
Dr. José Antonio Niño Ramos Director de la Unidad De Posgrado	
_____ Nombres y Apellidos DNI: 26613371	

* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

COPYRIGHT © 2024 by
JOSÉ ELÍAS RAFAEL BAUTISTA
Todos los derechos reservados



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDUCD
Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 10:00 horas, del día 22 de febrero de dos mil veinticuatro, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el, **Dr. JOSÉ FERNANDO CORONADO LEÓN**, e integrado por el **Dr. JOSÉ ANTONIO NIÑO RAMOS** y **Dr. GILBERTO FERNÁNDEZ IDROGO**, y en calidad de Asesor el **Dr. CORPUS HILDEBRANDO CERNA CABRERA**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Doctorado de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se inició la Sustentación de la Tesis titulada **"CALIDAD ESPERMÁTICA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS REPRODUCTORES DE CAJAMARCA EVALUADOS POR MICROSCOPIA Y CITOMETRÍA DE FLUJO"**, presentada por M. Cs. **JOSÉ ELÍAS RAFAEL BAUTISTA**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó Aprobada con la calificación de 18 (Dieciocho)..... la mencionada Tesis; en tal virtud, el M. Cs. **JOSÉ ELÍAS RAFAEL BAUTISTA**, está apto para recibir en ceremonia especial el Diploma que la acredita como **DOCTOR EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, con Mención en **CIENCIAS VETERINARIAS**.

Siendo las 11:45 horas del mismo día, se dio por concluido el acto.


.....
Dr. Corpus Hildebrando Cerna Cabrera
Asesor


.....
Dr. José Antonio Niño Ramos
Jurado Evaluador


.....
Dr. José Fernando Coronado León
Jurado Evaluador


.....
Dr. Gilberto Fernández Idrogo
Jurado Evaluador

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, quienes han sido mi faro constante de apoyo, motivación y ejemplo de perseverancia y dedicación.

A mis hermanos, por ser mis aliados incondicionales en este viaje académico. Su ánimo y aliento han sido la luz que iluminaron los momentos desafiantes. Este logro es tanto de ustedes como mío.

A mi esposa por el apoyo incondicional y la paciencia interminable. Este logro lleva impresa la huella del sacrificio y el aliento.

A mi hija, cada página es un tributo a los sueños y anhelos que tengo para ti.

A mis amigos, quienes han compartido risas, desafíos y momentos de descanso en este camino. Sus palabras alentadoras y su compañía han sido un bálsamo en las jornadas más intensas.

A mis profesores y asesor cuyo conocimiento y orientación han sido pilares fundamentales. Agradezco la paciencia, la dedicación y el constante estímulo para ir más allá de mis límites

A todos aquellos que, de alguna manera, han sido parte de esta travesía de la investigación.

AGRADECIMIENTO

A Dios por concederme la salud en estos tiempos difíciles y poder culminar con este trabajo de investigación.

A mis padres, hermanos y demás familiares, quienes han sido un sólido pilar de apoyo. Vuestra comprensión, ánimo constante y amor incondicional han sido el combustible que impulsó mi perseverancia.

A mi esposa Patricia e hija Nayeli por la paciencia, comprensión y apoyo en los momentos de intensidad académica han sido fundamentales, este logro es vuestro también.

A mi asesor Dr. Corpus Cerna por su orientación experta, paciencia infinita. Su sabiduría y guía han sido fundamentales en cada paso de este proceso. Agradezco la generosidad con la que compartió sus conocimientos y la confianza depositada en mi capacidad para llevar a cabo esta investigación.

Al colega José Huingo, por apoyar con el trabajo de colección y congelación seminal de los reproductores.

No importa lo lentos que vayamos, siempre y cuando no nos detengamos.

Confucio.

CONTENIDOS

Ítem	Página
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
CONTENIDOS.....	viii
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
LISTA DE ABREVIACIONES.....	xv
PREFACIO.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO II.....	5
MARCO TEORICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Base teórica	8
2.2.3.1. Enfriamiento y shock por frío.....	16
2.2.3.2. Criopreservación y crioprotectores.....	18
2.2.4.1. Integridad de membrana y organelos.....	22
2.2.4.1.1. La membrana plasmática.....	22
2.2.4.1.2. Acrosoma.....	23
2.2.4.1.3. Mitocondrias.....	24

CAPITULO III	25
CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS.	25
3.1. Hipótesis.	25
3.2. Localización.....	25
3.3. Unidad de análisis, población y muestra.	25
3.3.1. Material biológico.	25
3.3.1.1. Selección de animales y muestras.	25
3.3.3.2. Recolección y procesamiento del semen.....	26
3.3.3.3. Preparación del semen antes del análisis.	27
3.3.3.4. Análisis de semen por microscopía de contraste.....	27
3.3.3.5. Análisis de citometría de flujo.....	27
3.3.3.5.1. Viabilidad espermática.	27
3.3.3.5.2. Integridad del acrosoma.....	28
3.3.3.5.3. Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)	29
3.4. Análisis estadístico.	30
CAPITULO IV	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. Evaluación de características espermáticas por microscópica.	31
4.2. Evaluación de características espermáticas por citometría de flujo.....	34
4.2.1. Viabilidad espermática mediante SYBR-14 y PI	34
4.2.2. Potencial de la membrana mitocondrial.....	36
4.2.3. Integridad de la membrana acrosomal.	38

CAPÍTULO VI	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
ANEXOS.....	51

INDICE DE ILUSTRACIONES.

Tablas.

Tabla 1: Estadísticas descriptivas de los datos de control de calidad del semen posterior a la descongelación (De Jarnette et al., 2021)	7
Tabla 2: Características espermáticas evaluadas por microscopía y por citometría de flujo en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca-2022 (n=27).....	31
Tabla 3: Vitalidad espermática (SYBR-14), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridad de membrana acrosomal (IMA) entre razas, evaluados por citometría en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022.....	40
Tabla 4: Viabilidad espermática (SYBR-14), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridad de membrana acrosomal (IMA) según el dilutor seminal, evaluados por citometría en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca - 2022	41
Tabla 5: Coefficientes de correlación entre las características espermáticas evaluadas por microscopía y por citometría de flujo en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022.....	42

Figuras.

Figura 1 Espermatogénesis de mamíferos. A La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos del interior de los testículos. B: las células germinales primordiales (espermatogonias) se diferencian en espermatidas primarias y secundarias, espermatocitos y espermatozoides: Las células de Sertoli proporcionan el entorno para una espermatogénesis exitosa. D : Esquema de las meiosis I y II.	8
Figura 2: Morfología y metabolismo energético del espermatozoide a partir de la glucosa en la pieza media y principal (Olivera et al., 2006).....	9
Figura 3: Consecuencias del proceso de congelación sobre la integridad de la membrana espermática de los sementales (Contreras et al., 2023).....	11
Figura 4: Diseño para la investigación: Se usó tres toros por cada raza, del total de pajuelas almacenadas por cada toro, se tomarán tres pajuelas para realizar la evaluación.	26
Figura 5: Caja de bigotes de motilidad, concentración y morfología normal de espermatozoides evaluados en 27 muestras de semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022.	33
Figura 6: Caja de Bigotes de Viabilidad espermática (SYBR-14) evaluados por citometría de flujo en 27 muestras de semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022	34
Figura 7: Espermatozoides de toros reproductores de Cajamarca analizados mediante citometría de flujo por imágenes utilizando los fluorocromos SYBR-14 e yoduro de propidio (IP) observados en campo claro (Ch01), con fluorescencia (Ch02/Ch05/Ch11), combinación de campo claro y fluorescencia (Ch01/Ch02/Ch05/Ch11).	35

Figura 8: Caja de Bigotes del Potencial de la Membrana Mitocondrial evaluados por cartometría en 27 muestras de semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022	37
Figura 9: Caja de Bigotes del IMA evaluados por citometría de 27 muestras de semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022.	38
Figura 10: Patrones de espermatozoides de toros reproductores de Cajamarca incubados con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) y yoduro de propidio (PI), observados en campo claro (Ch01), combinación de campo claro y fluorescencia (Ch01/Ch02/Ch05) y con fluorescencia (Ch02/Ch05). A) Espermatozoide vivo con reacción acrosomal (PSA+ y PI-). B) Espermatozoide muerto sin reacción acrosomal (PSA- y PI+). C) Espermatozoide muerto con reacción acrosomal (PSA+ y PI+). D) Espermatozoide vivo sin reacción acrosomal (PSA- y PI-).....	39

Anexos.

Anexo 1: Análisis de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de Motilidad, concentración espermática y morfología (normales).....	51
Anexo 2: Prueba de valores atípicos: Motilidad (%), Concentración (millones), Morfología (% normales).....	51
Anexo 3: Análisis de Shapiro-Wilks (modificado) para determinar la normalidad de SYBR + (%) y PI+ (%).....	52
Anexo 4: Prueba de valores atípicos: SYBR+ (%), PMM Alto (%), IMA(%), PI+ (%).	52
Anexo 5: Análisis de Shapiro-Wilks modificado para determinar la normalidad de Potencial de la Membrana Mitocondrial.....	53
Anexo 6: Correlaciones.....	54
Anexo 7: ANOVA de un solo factor de la viabilidad espermática SYBR+ (%) vs. Raza	54
Anexo 8: ANOVA de un solo factor: Potencial de Membrana Alto PMM (%) vs. Raza	56
Anexo 9: ANOVA de un solo factor: SYBR+ (%) vs. Color	57

LISTA DE ABREVIACIONES.

PI: Yoduro de propidio.

PMM: Potencial de membrana mitocondrial.

IMA: Integridad de membrana acrosomal.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

PSA: Aglutinina de *Pisum sativum*.

PNA: Aglutinina de *Arachis hypogaea*.

IA: Inseminación artificial.

TE: Transferencia embrionaria.

PREFACIO

La congelación de semen, una práctica vital en la inseminación artificial y la preservación de la genética, se convierte en nuestro campo de estudio. Aquí la calidad espermática emerge como un actor principal, determinando el éxito o fracaso de los programas de reproducción. En este escenario, la microscopia se convierte en nuestra brújula, revelando los detalles más íntimos de la morfología y motilidad espermáticas, mientras que la citometría de flujo nos proporciona una ventana hacia el universo invisible de la viabilidad y la funcionalidad espermáticas.

A lo largo de estas páginas, nos sumergimos en la intersección entre biología reproductiva y la tecnología avanzada, buscando no solo comprender, sino también mejorar la praxis de congelación de semen y, por ende, optimización de los programas de reproducción asistida.

En última instancia, esta tesis no solo es un registro de observaciones científicas, sino un testimonio del compromiso con la mejora continua en el área de la reproducción animal. A través de la síntesis de conocimientos tradicionales y tecnologías emergentes, aspiramos a ir descubriendo y forjando el camino de la evaluación de calidad espermática en semen congelado de toros de la región de Cajamarca. Asimismo, contribuir al avance de la ciencia reproductiva y la prosperidad de la industria ganadera regional y del país.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad espermática en semen congelado de toros reproductores de la región Cajamarca, de las razas Holstein, Brown Swiss y Fleckvieh; para ello, se trabajó con tres toros por cada raza, analizando 3 pajuelas por toro (27 pajuelas en total). Se evaluaron las variables motilidad, concentración y morfología mediante la técnica de microscopía cuyos valores medios fueron: 40.37 ± 19.79 %, 89.07 ± 39.52 % y 81 ± 5.95 %, respectivamente; las variables evaluadas mediante citometría de flujo por imágenes fueron: viabilidad espermática evaluado mediante (SYBR 14/PI), potencial de membrana mitocondrial (PMM) evaluado mediante MitoTracker Deep Red FM e integridad de membrana acrosomal (IMA) mediante FITC-PSA/PI; cuyos valores fueron: 17.5 ± 7.79 %, 22.67 ± 8.96 % y 19.24 ± 8.15 % respectivamente. Las correlaciones entre las variables espermáticas determinadas por microscopía y citometría de flujo por imágenes, se calcularon usando el coeficiente de correlación de Spearman, indicando que existe una relación directamente proporcional ($r: 0.791; p < 0.01$) entre viabilidad con PMM; ($r: 0.647; p < 0.01$) entre viabilidad con IMA y ($r: 0.600; P < 0.01$) entre PMM con IMA. No se encontró correlación entre las variables evaluadas por microscopía y estas con las variables evaluadas por citometría de flujo.

Palabras clave: Toros, calidad espermática, viabilidad, potencial de membrana mitocondrial, integridad membrana acrosomal, citometría de flujo.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the sperm quality in frozen semen from breeding bulls from the Cajamarca region, of the Holstein, Brown Swiss and Fleckvieh breeds; To do this, we worked with three bulls for each breed, analyzing 3 straws per bull (27 straws in total). The variables motility, concentration and normal morphology were evaluated using the microscopy technique, the mean values of which were: $40.37 \pm 19.79\%$, $89.07 \pm 39.52\%$ and $81 \pm 5.95\%$, respectively; The variables evaluated by imaging flow cytometry were: sperm viability evaluated by (SYBR 14/PI), mitochondrial membrane potential (PMM) evaluated by MitoTracker Deep Red FM and acrosomal membrane integrity (IMA) by FITC-PSA/PI; whose values were: $17.5 \pm 7.79\%$, $22.67 \pm 8.96\%$ and $19.24 \pm 8.15\%$ respectively. The correlations between the sperm variables determined by microscopy and image flow cytometry were calculated using Spearman's correlation coefficient, indicating that there is a directly proportional relationship ($r:0.791$; $p<0.01$) between viability with PMM; ($r:0.647$; $p<0.01$) between viability with IMA and ($r: 0.600$; $P<0.01$) between PMM with IMA. No correlation was found between the variables evaluated by microscopy and these with the variables evaluated by flow cytometry.

Keywords: Bulls, sperm quality, viability, mitochondrial membrane potential, acrosomal membrane integrity, flow cytometry.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

En la región Cajamarca se realiza trabajos de criopreservación de semen a toros reproductores de diferentes razas. La evaluación de la calidad espermática se realiza con microscopía, analizando las variables seminales y espermáticas de manera subjetiva. No existen reportes de la valoración de la calidad espermática usando métodos con mayor objetividad, precisión y repetibilidad, como el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) y citometría de flujo. En las técnicas de reproducción asistida como la I.A, fertilización in vitro y otras, el semen no se introduce directamente en el tracto genital femenino en el momento de la eyaculación, sino que primero se colecta, se diluye, se envasa y se congela por un tiempo prolongado antes de ser usado, obviando y superando las barreras de selección espermática que filtran espermatozoides de calidad subóptima en el recorrido por el tracto genital de la vaca. Todos los pasos del procesamiento del semen provocan daños en la membrana plasmática, orgánulos y ADN de las células espermáticas. Por ende, para tener mejores resultados de fertilización y preñez de las vacas es necesario evaluar la calidad de los espermatozoides justo antes de ser usados en cualquier técnica de reproducción asistida.

La industria de la I.A. se fundó en el análisis subjetivo de la motilidad e integridad del acrosoma, pero desde enero del 2009 se viene aplicando la citometría de flujo como técnica objetiva para el control de calidad de características espermáticas en semen congelado de toros a nivel comercial (DeJarnette et al., 2021).

Las variables espermáticas funcionales evaluadas por citometría de flujo son: integridad de membrana plasmática(viabilidad), potencial de membrana mitocondrial

(PMM), integridad de membrana acrosomal (IMA), fragmentación del ADN, peroxidación lipídica.(Silva and Gadella, 2006)

Evaluar la integridad de la membrana acrosomal es importante porque allí se encuentran las enzimas necesarias para llevar a cabo la fertilización. Para evaluar la integridad acrosomal se pueden usar las lectinas: *Pisum sativum* (PSA) y *Arachis hipogaea* (PNA) conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA y FITC-PSA). PNA se une a β -galactosa dentro de la membrana acrosómica externa, en cambio PSA se une a glicoproteínas que se encuentran en la matriz acrosómica. Los espermatozoides con acrosomas reaccionados o dañados presentan fluorescencia verde. (Kumaresan et al., 2017; Silva and Gadella, 2006)

Medir el PMM es otra forma de valorar la calidad espermática de manera más objetiva, las mitocondrias se ubican en la parte media del espermatozoide y son las responsables de producir energía derivada del ATP necesario para el movimiento flagelar, por lo tanto, el PMM es un indicador directo de motilidad e indirecto de capacidad fecundante. Cualquier falla en PMM afecta la funcionalidad espermática. Se usan las sondas MitoTracker Red CMXRos y MitoTracker Deep Red FM (Allauca et al., 2019; Silva and Gadella, 2006).

Si la membrana del espermatozoide no está funcionalmente intacta, se considera deteriorado (muerto) por lo tanto incapaz de fertilizar. La importancia de la membrana es mantener la estabilidad de los organelos, el gradiente químico y facilita el ingreso de glucosa y fructosa que sirven como sustrato para la producción de ATP. El kit de viabilidad espermática LIVE/DEAD usa las sondas SYBR-14 y PI. Utiliza el láser azul para la excitación (488nm) y proporciona dos longitudes de onda de emisión: verde para espermatozoides vivos (521 nm SYBR-14) y rojo para espermatozoides muertos (635nm PI)(Peña et al., 2016; Silva and Gadella, 2006)

Algunos trabajos de investigación como el realizado en Colombia, en donde evaluaron los eyaculados de toros Angus y Holstein con la finalidad de determinar si existe alguna relación entre las variables espermáticas evaluadas de manera convencional con las variables evaluadas por citometría de flujo, determinándose que existe una relación media y alta entre el potencial de membrana mitocondrial con varias características que son evaluadas de manera convencional (Varela et al., 2020) .

El presente estudio tuvo como objetivo evidenciar la relación y la calidad espermática del semen congelado de toros reproductores de Cajamarca de diferentes mediante microscopía y citometría de flujo por imágenes.

Las características espermáticas evaluadas por microscopía fueron (motilidad, concentración y morfología) y por citometría de flujo (Viabilidad espermática, potencial de membrana mitocondrial e integridad de la membrana acrosomal). Se utilizó tres toros por cada raza Holstein, Brown Swiss y Fleckvieh; además se usó 03 pajuelas por cada toro, las muestras fueron evaluadas en el laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Objetivos

Objetivo general

Evidenciar la relación y la calidad espermática del semen congelado de toros reproductores de Cajamarca de diferentes razas mediante microscopía y citometría de flujo por imágenes.

Objetivos específicos

1. Determinar la motilidad, concentración y morfología espermática del semen congelado de toros reproductores mediante microscopía.

2. Determinar la Viabilidad, Potencial de membrana mitocondrial e integridad de membrana acrosomal del semen congelado de toros reproductores mediante citometría de flujo por imágenes.
3. Relacionar la calidad espermática mediante las variables evaluadas por microscopía y citometría de flujo por imágenes.
4. Evaluar la calidad espermática entre toros de diferentes razas determinados mediante microscopía y citometría de flujo por imágenes.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

Las evaluaciones y cuantificación de las variables seminales: Integridad acrosómica y viabilidad de los espermatozoides en semen congelado-descongelado en pajuelas de 0.5 ml correspondientes a 12 toros Holstein; usando sondas fluorescentes combinadas de SYBR-14 y yoduro de propidio (PI) evaluadas por citometría de flujo y al compararlas con las mediciones microscópicas clásicas de integridad acrosómica y motilidad de los espermatozoides a través de microscopia de contraste se pudo determinar que existe diferencias significativas entre métodos y entre toros, pero no entre pajillas. Los promedios porcentuales obtenidos a través de la evaluación microscópica clásica fueron de: 57 ± 7.5 para el estatus acrosomal y 66 ± 5.8 para la viabilidad (motilidad 0h) y 24 ± 3.4 (motilidad 3h). Por otro lado, el promedio de la viabilidad evaluado con SYBR-14, PI fue de 51 ± 6.5 . Asimismo, hubo una alta correlación ($r = 0.96$) entre viabilidad determina de forma clásica con la determinada por SYRB 14-PI (Thomas et al., 1997).

Otros estudios mostraron que existe un vínculo entre la fertilidad de los toros con características evaluadas por citometría de flujo como la integridad de membrana plasmática e integridad del acrosoma y la función mitocondrial (Birek et al., 2010; Christensen et al., 2011).

En el trabajo realizado por Morrell et al (2018) en donde evaluaron la calidad espermática de toros reproductores de razas productoras de carne y leche. Pudieron determinar que en los toros de carne hubo una correlación significativa ($r = 0.62$, $p < 0.05$) entre la morfología normal y con la tasa de no retorno a los 56 días, no sucedió así con los toros de razas lecheras. Por otro lado, las características: integridad de membrana

(46 versus 40 %), morfología normal (87 versus 76 %) y la actividad respiratoria (52 versus 12 %) fueron mayores en toros de razas lecheras. El índice de fragmentación de ADN fue menor en espermatozoides de toros de razas lecheras comparados con los de carne (3.8 versus 6.1 %). La motilidad fue mayor en toros lecheros, asimismo el análisis multivariado indicó que la raza de los toros influye en la calidad espermática.

Según el trabajo realizado por Varela et al (2020), en Colombia evaluaron 10 eyaculados de cinco toros de las razas Angus y Holstein, en donde encontraron que existe una correlación alta y media entre el potencial de membrana mitocondrial con diferentes características de calidad espermática evaluadas de manera convencional. ($p < 0.5$), además se determinaron que la mayoría de los coeficientes de regresión para espermatozoides con mayor potencial de membrana mitocondrial y estabilidad de membrana plasmática, indicaron incrementos significativos en la calidad de semen congelado-descongelado. Por lo tanto, una de sus conclusiones indica que la integridad de la membrana plasmática y la actividad mitocondrial evaluada por citometría de flujo están asociadas con la calidad espermática de forma convencional.

La aplicación de la citometría de flujo en el análisis de las características espermáticas de manera comercial, se inició en enero del 2009 y se tiene reportes hasta enero del 2021, con análisis de 30 500 lotes de semen por año de toros productores de carne y leche. Los valores de calidad espermática se presentan en la tabla 1 (DeJarnette et al., 2021).

Tabla A. Estadísticas descriptivas de los datos de control de calidad del semen posterior a la descongelación (De Jarnette et al., 2021)

Variable	Número de lotes analizados	Media \pm SEM
Motilidad CASA inicial 0 h	95595	46,8 \pm 0,043
Volver a comprobar motilidad CASA 0 h	13728	30,4 \pm 0,104
Motilidad CASA inicial 3 h	69876	43,5 \pm 0,052
Volver a comprobar la motilidad CASA 3 h	8424	29,8 \pm 0,130
Viabilidad inicial	359617	52,8 \pm 0,021
Volver a verificar la viabilidad	42151	41,9 \pm 0,071
Integridad inicial del ADN	61382	68,0 \pm 0,064
Volver a verificar la integridad del ADN	5248	60,6 \pm 0,245
Motilidad subjetiva inicial 0 h	279,415	73,2 \pm 0,016
Volver a comprobar la motilidad subjetiva 0 h	41,750	61,5 \pm 0,063
Motilidad subjetiva inicial 3 h	291,548	31,7 \pm 0,017
Volver a comprobar la motilidad subjetiva 3 h	36,490	22,5 \pm 0,039
Morfología normal de los espermatozoides	127,698	68,3 \pm 0,019
Esperma por pajilla(x10 ⁶)	369,317	21,9 \pm 0,012

2.2. Base teórica

2.2.1. Producción y anatomía espermática

El espermatozoide se produce a través de un proceso de división celular meiótica conocida como espermatogénesis a partir una célula germinal o espermatogonia en los túbulos seminíferos del testículo, bajo influencia hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Cada espermatogonia produce cuatro espermatocitos; estos espermatocitos por influencia de la célula de Sertoli se transforman en espermatozoides a través del proceso llamado espermiogénesis, que consta de cuatro fases: la de Golgi, la de capuchón, la acrosomal y la maduración. Están formados por tres regiones subcelulares: cabeza y un flagelo compuesto por una pieza media proximal, pieza principal y pieza terminal (Olivera et al., 2006; Tecle and Gagneux, 2015a). (figura1, 2).

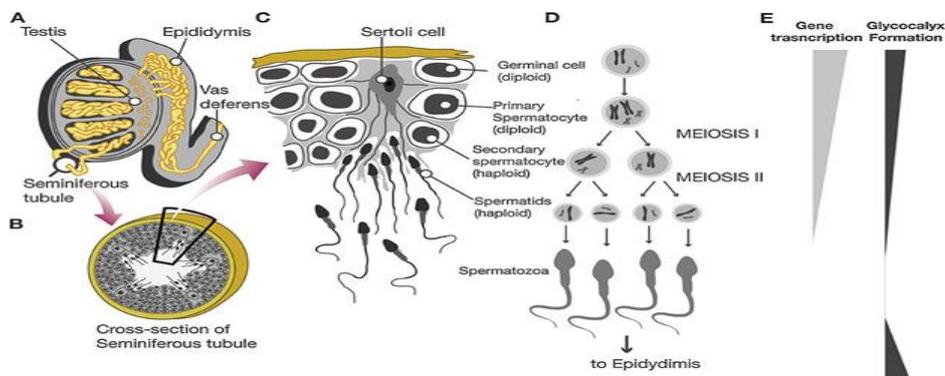


Figura 1. Espermatogénesis de mamíferos. A La espermatogénesis tiene lugar en los túbulos seminíferos del interior de los testículos. B: las células germinales primordiales (espermatogonias) se diferencian en espermátidas primarias y secundarias, espermatocitos y espermatozoides: Las células de Sertoli proporcionan el entorno para una espermatogénesis exitosa. D : Esquema de las meiosis I y II.

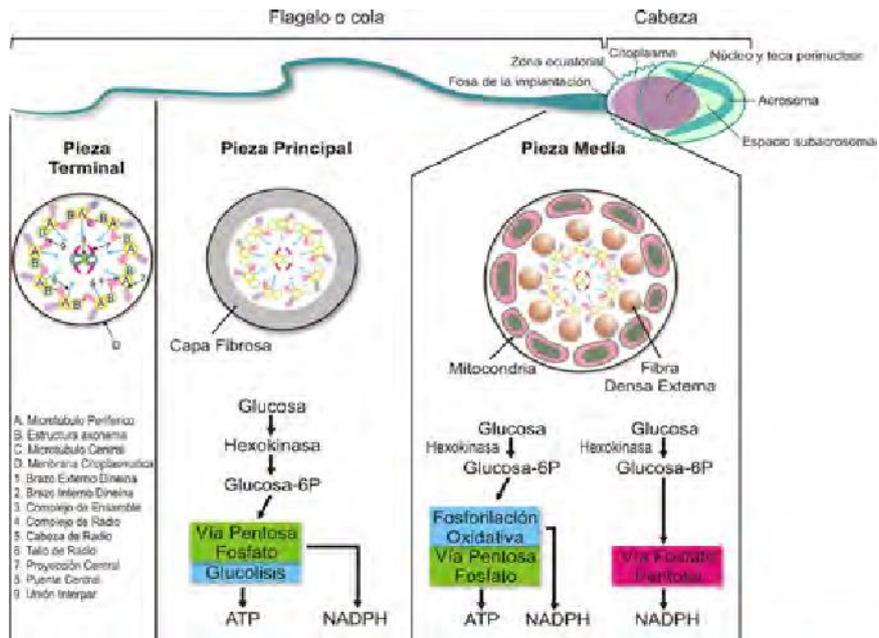


Figura 2. Morfología y metabolismo energético del espermatozoide a partir de la glucosa en la pieza media y principal (Olivera et al., 2006).

2.2.1.1. La cabeza del espermatozoide.

La forma de la cabeza es distinta en cada especie, piriforme en humanos, falciforme en roedores, aplanada en toros, carneros y perros. La mayor parte del volumen de la cabeza espermática está formado por núcleo y el acrosoma (Auger, 2018).

2.2.1.2. Acrosoma.

Cubre la parte anterior de la cabeza del espermatozoide. El tamaño y forma del acrosoma depende de la morfología de la cabeza del espermatozoide de acuerdo a cada especie, en forma de casquete o paleta en mamíferos grandes incluido el ser humano y forma de hoz en los roedores. La membrana acrosomal interna y externa forman una estructura en forma de saco o vesícula con un segmento anterior y ecuatorial. En el acrosoma están presentes múltiples enzimas hidrolasas como la acrosina, hialuronidasa, fundamentales para el proceso de fertilización a través de la reacción acrosómica, en donde ocurre la liberación y activación de las enzimas acrosómicas y de esta manera los espermatozoides puedan penetrar la zona pelúcida del ovocito (Auger, 2018; Eddy, 2006).

2.2.1.3.Núcleo

El núcleo alberga el genoma del espermatozoide, la cromatina está altamente condensada en proteínas de histonas y protaminas, necesarias para asegurar la motilidad y fertilización. La protamina se une al ADN del espermatozoide con la finalidad de mantener su integridad, las dos funciones principales del núcleo es facilitar el movimiento del espermatozoide debido a la característica hidrodinámica de la cabeza y entregar su contenido intacto al ovocito al momento de la fertilización (Bollwein and Malama, 2023; Okada, 2022).

2.2.1.4.Cuello

Es un segmento corto que une la cabeza con la cola del espermatozoide, consta de un centriolo proximal conformado por nueve tripletes de microtúbulos y un centriolo distal que se extiende hasta el axonema.

2.2.1.5.Flagelo o cola.

Es la parte más larga, consta de una pieza intermedia, principal y terminal; la membrana plasmática rodea al flagelo, tiene un axonema central conformado por nueve pares de microtúbulos, los cuales están rodeados por una hélice de mitocondrias que proporcionan la energía necesaria para la motilidad espermática. El axonema o maquina molecular está conformado por más de 60 proteínas, las más frecuentes son las tektinas y tubulinas (Leung et al., 2023).

2.2.1.6.Mitocondrias espermáticas.

Los espermatozoides de los mamíferos pueden tener entre 50 y 75 mitocondrias. Las mitocondrias poseen una membrana externa que contiene poros proteicos llamados porinas que facilita el paso de iones y metabolitos hacia la membrana mitocondrial interna para la producción de ATP mediante fosforilación oxidativa. La membrana interna tiene

crestas o invaginaciones. Es necesario que la membrana mitocondrial interna esté intacta e impermeable para que sea funcional (Moraes and Meyers, 2018).

El PMM es la gradiente de protones por el paso de electrones a través de la cadena de transporte de electrones para ser usado por la ATP sintasa para generar ATP, especies reactivas de oxígeno (ROS), señalización de calcio, termogénesis y apoptosis. La energía es usada para la motilidad progresiva, capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica (Foutouhi and Meyers, 2022; Nguyen et al., 2023).

2.2.1.7. Membrana plasmática

El espermatozoide está cubierto por una membrana plasmática de naturaleza lipoproteica que contiene glicoproteínas organizada en una bicapa lipídica principalmente de colesterol, fosfolípidos y diversas proteínas (Bollwein and Malama, 2023; Contreras et al., 2023).

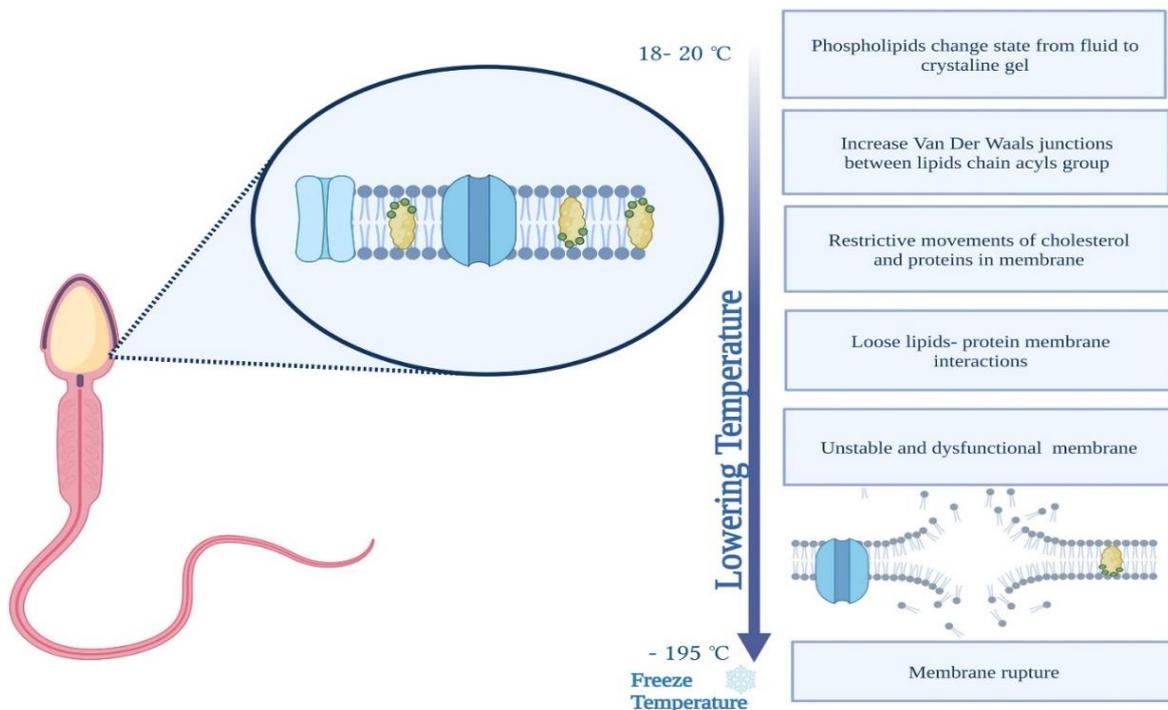


Figura 3. Consecuencias del proceso de congelación sobre la integridad de la membrana espermática de los sementales (Contreras et al., 2023).

2.2.2. Obtención y evaluación del semen bovino

2.2.2.1. Recogida del Semen

En los centros genéticos e inseminación artificial el método usado de manera rutinaria es la vagina artificial, con excepciones donde los toros tienen problemas físicos o mal entrenados que se niegan a saltar, se usa electroeyaculador y/o masaje transrectal (Arieta Román et al., 2014).

2.2.2.2. Evaluación del semen

El análisis del semen es una evaluación indispensable ya que una disminución en la concentración, motilidad y morfología normal de espermatozoides, aporta información para identificar a los toros de muy baja fertilidad (Geoffrey H., 2001)

Para la evaluación convencional y rutinaria de una muestra de semen, el ejemplar debe estar clínica y reproductivamente sano, con buen libido y calidad espermática.

Dicha evaluación incluye características seminales macroscópicas como (volumen, color, densidad, cuerpos extraños, ph) y características espermáticas microscópicas (motilidad en masa, motilidad individual, concentración, vitalidad y morfología) (Gómez and Migliorisi, 2015)

La valoración seminal convencional, se lleva a cabo de la manera siguiente:

2.2.2.2.1. Evaluación macroscópica

El semen es recolectado en un tubo graduado de 15 ml, donde se mide el volumen que puede variar de 2 a 12 mL (Gómez and Migliorisi, 2002). Otra forma indirecta de medir el volumen del eyaculado es pesando la muestra. (Love, 2016). La variación del volumen depende mucho de la raza, edad, factores ambientales como: alimentación,

alojamiento, método y frecuencia de colección, número de eyaculados, época del año (Sieme, 2009).

La apariencia macroscópica del semen depende de la densidad, concentración espermática, composición del plasma seminal, componentes fisiológicos (células epiteliales) o patológicas (orina o sangre). El color normal del semen debe ser blanco lechoso con una consistencia acuosa o cremosa (Sieme, 2009).

Los estándares prácticos recomendados por Society for Teriogenology respecto a la densidad, relacionada con el color y la concentración es la siguiente (Albert D. Barth, 2006)

Muy bueno (VG) = semen cremoso y granulado con 750 millones a 1 billón de espermatozoides por mL.

Bueno (G) = semen lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides por mL.

Regular (F) = semen similar a leche descremada con 250 a 400 millones de espermatozoides por mL.

Pobre (P) = semen traslúcido

2.2.2.2.2. Evaluación microscópica.

2.2.2.2.2.1. Motilidad Espermática

La motilidad es uno de los parámetros más importantes de la analítica seminal. Se evalúa en dos momentos. El primero corresponde a evaluar la motilidad en masa. Para lo cual se coloca una gota de semen puro en una lámina portaobjetos limpio y sin grasa, para la lectura se necesita un microscopio con platina caliente a 37 °C y usando el objetivo de 10X, se procede a observar ondas y remolinos oscuros producidos por los espermatozoides y en base a la intensidad de estas ondas, los eyaculados se clasificarán

en una escala numérica de 0 a 4. Siendo 0 cuando no presenta ondas y 4 cuando las ondas son mueven rápidamente formando remolinos oscuros (Gómez and Migliorisi, 2002; Kumar Yata et al., 2020).

La evaluación de motilidad espermática ya sea de forma subjetiva u objetiva ha sido y seguirá siendo la medida más utilizada para predecir la calidad seminal y fertilidad de un toro (Utt, 2016).

En las recomendaciones hechas por Barth, (2006) para evaluar la motilidad masal sería de la siguiente manera:

Muy buena (VG) = presencia de remolinos oscuros y rápidos

Buena (G) = presencia de remolinos más lentos.

Regular (F) = sin remolinos, pero prominente movimiento celular individual.

Pobre (P) = poco o ningún movimiento celular individual.

Y por consiguiente para motilidad individual será de la siguiente forma:

Muy buena (VG) = 80 a 100 %

Buena (G) = 60 a 79 %

Regular (F) = 40 a 59 %.

Pobre (P) = menos del 40 % de motilidad.

Después de la descongelación los estándares mínimos de motilidad serán de 25 %, con 60 % de acrosomas intactos. Respecto a la morfología una muestra aceptable debe tener como mínimo 70 % de espermatozoides morfológicamente normales, con menos del 20 % de anomalías no compensables de la cabeza como vacuolas nucleares y cabezas piriformes (Thundathil et al., 2016a).

2.2.2.2.2. Morfología Espermática

La morfología espermática es otra característica importante que influye en la fertilidad de los espermatozoides. Las técnicas para estudiarlas son microscopía óptica, de contraste de fase y de fluorescencia. La mayor cantidad de estudios se han centrado en estudiar la morfología en la cabeza de los espermatozoides y pocos son los que han estudiado la morfología en el núcleo, el acrosoma y pieza media o flagelar. Los resultados morfología espermática pueden variar por factores intrínsecos como: La edad, raza, madurez sexual y subespecie y por factores extrínsecos como: el medio ambiente, y el procesamiento de la muestra (Yániz et al., 2015).

Esta característica identifica espermatozoides normales y anormales, para lo cual se pueden usar técnicas simples y rápidas como la coloración a base de eosina y nigrosina, que aparte de identificar la morfología espermática se puede determinar la viabilidad de los mismos (Love, 2016).

La frecuencia de anomalías espermáticas de cualquier tipo se ha correlacionado con la fertilidad. Cuando un toro contiene un alto porcentaje de anomalías espermáticas indica que existe una disfunción gonadal y esto tiende a incrementarse conforme avanza la edad. Las anomalías en la cabeza de los espermatozoides se han correlacionado con una reducción en la estructura de la cromatina y por ende existe una correlación negativa con la fertilidad, principalmente aquellos espermatozoides con cabeza en forma de pera (Al-Makhzoomi et al., 2008).

Las anomalías espermáticas se pueden presentar en la cabeza, pieza media y cola más cualquier remanente citoplásmico anormal. Los remanentes citoplásmicos o gotas citoplasmáticas generalmente se encuentran alrededor del cuello y pieza media pero ocasionalmente aparecen a lo largo de cola y alrededor de la cabeza, las gotas

citoplasmáticas se consideran normales cuando son menores que un tercio del tamaño de la cabeza, pero se consideran anormales cuando son mayores a un tercio en relación al tamaño de la cabeza del espermatozoide. Las principales anormalidades en el flagelo son: colas dobladas o rotas, horquilladas, cortas, enrolladas y gruesas. A nivel de la cabeza se puede encontrar espermatozoides con doble o triple cabeza, cabezas alargadas o piriformes, espermatozoide con macro y microcefalia, ausencia del acrosoma, espermatozoides con cabezas dismorfas o extrañas (Rothmann and Bort, 2018).

Otra forma de clasificación de las anormalidades es en primarias y secundarias. Los defectos primarios tienen su origen dentro de los testículos durante el proceso de espermatogénesis; y los defectos secundarios se originan dentro del epidídimo. Los rangos aceptables que se debe tener en un eyaculado son: 70 % de espermatozoides normales, 15 a 20 % en defectos nucleares, 25 % de defectos acrosómicos y en la cola del espermatozoide (Albert D. Barth, 2006).

2.2.3. Criopreservación del semen bovino

El semen bovino se colecta, se evalúa, se diluye, se enfría y se congela de forma indefinida en nitrógeno líquido.

2.2.3.1. Enfriamiento y shock por frío.

Todos los diluyentes deben proporcionar ciertas condiciones a los espermatozoides, una de ellas es la capacidad de amortiguación y los componentes que hacen esta acción son: Citrato, solución salina con fosfato, Tris (hidroximetil aminometano), HEPES, TES (ácido N-tris (hidroximetil) metil -2-aminoetano sulfónico), tricene, proteína de leche descremada y lecitinas de origen vegetal. De esta manera se facilita la actividad metabólica en el periodo de ambientación o descenso de la temperatura a 5 °C. (“shock térmico” ó “criocapacitación”) Por otro lado es necesario

mantener una presión osmótica de 285 mOsmol, aunque los espermatozoides pueden tolerar diluyentes ligeramente hiperosmóticos. Por otro lado, los azúcares simples como la glucosa, fructosa, manosa, arabinosa sirven se sustratos para proveer energía (Parkinson, Timothy J; Morrell, 2019).

El shock térmico causa daño en la membrana celular y provoca la pérdida de potasio intracelular, enzimas, lípidos, colesterol, lipoproteínas y ATP. Haciendo que los espermatozoides sean más permeables al calcio. La forma efectiva para proteger a los espermatozoides del shock térmico es agregando a los diluyentes yema de huevo, leche descremada, leche de coco. Los componentes químicos de estas sustancias que protegen a los espermatozoides son las lipoproteínas de baja densidad (LDL), lecitinas; quienes forman una capa protectora o reemplazan los fosfolípidos de membrana que se pierden o dañan, pero también uniéndose a las proteínas del plasma seminal bovino (BSP) y evitando que estas se unan a la membrana del espermatozoide y provoque la pérdida de fosfolípidos y colesterol (Parkinson, Timothy J; Morrell, 2019).

El proteoma espermático en las principales especies de animales domésticos indica por ejemplo que existen 1723 proteomas en el semen de los cerdos; de las cuales 22 son las más abundantes en espermatozoides eyaculados que los que se encuentran en el epidídimo, de la misma manera de los 685 proteomas en el semen del carnero, 37 son las más abundantes. Datos encontrados por Pérez-Patiño, citados por (Rickard et al., 2019).

Leahy and Gadella, (2011) en su trabajo sobre cambio en la superficie del esperma y consecuencias fisiológicas inducidas por el manejo y almacenamiento de los espermatozoides. Nos indica que cuando los espermatozoides interactúan con su entorno inmediato, este contacto remodela la superficie de los espermatozoides preparándolos

para el proceso de fertilización. Dichos eventos incluyen la capacitación, no es más que un pequeño proceso de desestabilización de la membrana perdiendo los factores de decapitación, cambios en la organización lateral de las proteínas y lípidos.

Hay que conocer también que los espermatozoides están cubiertos por una capa gruesa de glicocaliz y lo adquiere durante el desarrollo (solo aquí puede sintetizar glucanos de novo), maduración (a nivel de epidídimo se producen glucoproteínas y glucolípidos unidos con glucofosfatidilinositol y glucado que facilita la unión con la membrana de espermatozoide) y al momento del contacto con el líquido seminal. El glicocaliz favorece la supervivencia en el tracto femenino: Inhibiendo la capacitación prematura, paso a través del moco cervical, protección contra la inmunidad femenina, formación del reservorio de espermatozoides y protegiendo las proteínas espermáticas que intervendrán en la fertilización (Teclé and Gagneux, 2015b).

2.2.3.2. Criopreservación y crioprotectores.

La criopreservación del espermatozoide facilita el almacenamiento y transporte; pero el procedimiento en sí expone a las células al estrés, provocando daño celular que compromete la funcionalidad que muchas veces es irreversible. Para minimizar esto es necesario de agentes crioprotectores como el glicerol en concentraciones de 3-4 % si el extensor tiene disacáridos o 7 % si no tiene disacáridos (Parkinson, Timothy J; Morrell, 2019).

Los agentes crioprotectores se clasifican en penetrantes o permeables como el glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO), dimetil acetaldéhid, propilenglicol y etilenglicol que ingresan a través de la membrana plasmática y reemplazan el contenido de agua, reduciendo el daño de los solutos porque evita la formación de cristales. Crioprotectores no penetrantes o no permeables como la rafinosa, sacarosa, citrato de yema de huevo,

albúmina, polietilenglicol, polivinilpirolidona. No penetran la membrana celular y actúan acelerando la deshidratación en un proceso de enfriado rápido, minimizando la formación de cristales de hielo intracelular (Hezavehei et al., 2018; Parkinson, Timothy J; Morrell, 2019; Sieme et al., 2016).

También se están usando los antioxidantes para neutralizar las ROS (especies reactivas de oxígeno) y el estrés oxidativo durante la congelación. Según su estructura química los antioxidantes se dividen en enzimáticos (glutatión peroxidasa = GPx, SOD y catalasa) y no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, selenio, zinc). Además, se está utilizando algunas proteínas anticongelantes (AFP) y glucoproteínas anticongelantes (AFGP), que actúan disminuyendo el punto de congelación, inhibiendo la formación de cristales de hielo y estabilizando los fosfolípidos y ácidos grasos insaturados de las membranas plasmáticas, preservando la integridad de la membrana (Hezavehei et al., 2018).

El principio de la criobiología está basado en la “hipótesis de dos factores” respecto a las lesiones de las células durante la congelación, fue diseñada por Peter Mazur en 1972. Cuyos postulados son: “algunos de nosotros creemos que hay *al menos* dos factores responsables de las lesiones, y que uno de ellos es la formación de hielo dentro de la célula”; "La existencia de una velocidad de enfriamiento óptima debe significar que la supervivencia se ve afectada por al menos dos factores que dependen opuestamente de la velocidad de enfriamiento". El segundo es el efecto osmótico, que provoca la deshidratación celular (Pegg and Kleinhans, 2016).

Mazur (1963) decía: las células muestran una velocidad de enfriamiento óptima específica, donde los daños producidos por la deshidratación (lesión por efecto de los solutos) y la formación de cristales de hielo intracelular es mínimo, asegurando que la

supervivencia celular después de la descongelación sea máxima. Todo esto depende de la permeabilidad hidráulica de la membrana.

La permeabilidad de membrana disminuye conforme va desendiendo la temperatura, pero los agentes crioprotectores aumentan la permeabilidad de las membranas para el agua, facilitando la deshidratación de las células cuando son expuestas a temperaturas de congelación e incluso a temperaturas bajo cero (Akhoondi et al., 2011).

En el proceso de criopreservación ocurren los siguientes eventos: En primer lugar, cuando la temperatura del medio extracelular cae por debajo del punto de congelación se forman cristales de hielo, los que hacen que se incremente la concentración de solutos y por ende la presión osmótica. Como consecuencia ocurre una deshidratación celular por la eminente pérdida de agua hacia la parte externa de la célula para mantener el equilibrio en la concentración de solutos. Si las células se deshidratan más de lo normal puede ser letal, esto ocurre cuando se realiza un proceso de congelación lento. La segunda forma que puede ser letal para la célula es cuando se ejecuta un proceso de congelación rápido que evita que la célula se deshidrate y por lo tanto quede la suficiente cantidad de agua en el espacio intracelular promoviendo la formación de cristales de hielo que producen daño físico a las membranas internas (Parkinson, Timothy J; Morrell, 2019; Sieme et al., 2016).

A los dos efectos mencionados anteriormente también hay que añadir la velocidad de congelación y temperatura de descongelación. Cuando las células se enfrían muy rápido, no pierden la suficiente cantidad de agua y facilita la formación de cristales internos y cuando la velocidad es muy lenta las células pueden perder demasiada cantidad

de agua inducidas osmóticamente (Parkinson, Timothy J; Morrell, 2019; Sieme et al., 2016).

El proceso de criopreservación de espermatozoides involucra los siguientes procesos: colección de semen, dilución en el extensor (que contiene nutrientes y protectores), envasado (generalmente en pajillas de plástico de 0.25 o 0.5 mL), enfriamiento (lentamente desde la temperatura ambiente hasta los 5 °C a una velocidad aproximada de 0.1 a 0.3 °C min⁻¹), por un tiempo de 4 horas; luego se realiza la congelación (a una velocidad de 10 a 60 °C min⁻¹ hasta temperaturas tan bajas como – 80 o -120 °C.), Después las pajillas se sumergen en nitrógeno líquido para su almacenamiento y conservación (Kumar Yata et al., 2020; sieme and Oldenhof, 2015).

Para la congelación, las pajillas se colocan de forma horizontal sobre un bastidor o rampa. La rampa con las pajillas se introduce en un congelador que tiene graduado la velocidad de disminución de la temperatura de forma automática. Pero una forma práctica es colocar el bastidor con las pajillas en una caja de poliestireno (tecnopor) cerrada, para ser expuestas primeramente al vapor del nitrógeno líquido por un tiempo (10 minutos) y una distancia (6 cm) sobre el nivel del nitrógeno (Kumar Yata et al., 2020; Sieme et al., 2016).

El proceso de descongelación de las pajillas debe ser rápido porque si se hace de forma lenta, nuevamente se formarían cristales de hielo que podrían producir daño en la membrana celular. En la práctica las pajillas se descongelan en agua tibia con un rango de temperatura de 30 a 37 °C por 10 a 30 segundos (Kumar Yata et al., 2020; Parkinson, Timothy J; Morrell, 2019).

2.2.4. Citometría de flujo, principios básicos.

La citometría de flujo es una tecnología que analiza y mide simultáneamente múltiples características físicas de un solo espermatozoide. Por ejemplo, se puede medir el tamaño de los espermatozoides, a través de los detectores de dispersión directa, de dispersión lateral y detectores de fluorescencia. La citometría de flujo usa un sistema de acoplamiento de fluidos y óptico a electrónico, en donde, cada célula espermática presente en la muestra, dispersa la luz laser incidente (espectro de absorción) y emite fluorescencia (espectro de emisión). En el citómetro de flujo, todos los espermatozoides son llevados a un punto de intercepción de láser, en una corriente de fluidos, cuando pasan por este lugar, dispersan la luz del láser, las moléculas fluorescentes presentes se estimulan y emiten luz en diferentes longitudes de onda, un sistema de lentes recoge la dispersión y la luz fluorescente, los filtros dirigen la fluorescencia a los detectores que producen señales electrónicas proporcionales a las señales ópticas que lo estimulan. Los datos de cada espermatozoide se almacenan en un ordenador, que luego son representados en forma de histogramas y puntos. Se utiliza compuestos fluorescentes como el isocianato de fluoresceína, tiene un espectro de absorción y emisión de 400-550 nm y 475-700 nm respectivamente (Peña et al., 2016a).

2.2.4.1. Integridad de membrana y organelos.

2.2.4.1.1. La membrana plasmática

Es la estructura que rodea al espermatozoide manteniendo unidos los organelos internos, manteniendo el equilibrio iónico y otros compuestos, gracias a la capacidad semipermeable de la misma, las proteínas de la membrana plasmática transportan la glucosa y fructosa desde el espacio extracelular, estos monosacáridos sirven como fuente

de energía (ATP) para el espermatozoide, el 90 % de ATP se forma por glucólisis anaeróbica (Flesch and Gadella, 2000).

Cuando la membrana no está funcionalmente intacta, el espermatozoide se considera muerto, por lo tanto, no es capaz de fertilizar. En tecnologías de reproducción asistida como la inseminación artificial y la fertilización in vitro, es esencial evaluar la integridad de la misma, para ello se usa colorantes impermeables, aquellas células que excluyen estos colorantes, se dice que están vivas. En citometría se usa una matriz de sondas fluorescentes que son impermeables a la membrana con afinidad por el ADN. En espermatozoides de han usado distintas sondas que funcionan bajo este principio, que tienen distintas propiedades de absorción y emisión; por ejemplo: Hoechst 33258 con 358 / 488 nm de longitud de onda de absorción y emisión respectivamente. SYBR-14 Y yoduro de propidio (PI), cuando se usan en conjunto, las células vivas emiten una fluorescencia verde brillante (SYBR-14), mientras que las células muertas con membranas celulares dañadas, emiten una fluorescencia roja (PI), ambas sondas se estimulan con el láser azul de 488 nm (Peña et al., 2016b, 2016a; Silva and Gadella, 2006).

2.2.4.1.2. Acrosoma.

Es un organelo secretor que contiene enzimas hidrolíticas y al entrar en contacto con el ovocito se producirá la reacción acrosómica, liberando las enzimas como la acrosina y con la movilidad hiperactiva ayudará a penetrar en la zona pelúcida (Hirose et al., 2020).

Por ello es importante que el que acrosoma de los espermatozoides deben permanecer intacto tras el paso por el tracto genital femenino, hasta su llegada al itsmo. Las reacciones tempranas del acrosoma hacen que el espermatozoide sea infértil, por

ende, tiene sentido evaluar la integridad, se hace a través de conjugados fluorescente de lectina, la lectina se une a carbohidratos específicos de las glucoproteínas que se encuentran únicamente en el acrosoma, los conjugados de lectina más importantes tenemos: aglutinina de *Pisum sativum* (guisante verde; PSA) y aglutinina de *Arachis hipogea* (maní; PNA); por lo tanto, para espermatozoides se usan: PNA-FITC (ex/em 488/515 nm de longitud de onda), PNA-TRITC (ex/em 568/590 nm de longitud de onda) y PNA-RPE (ex/em 488/620 nm de longitud de onda); la ausencia de fluorescencia es indicativo de un acrosoma intacto, y la fluorescencia indica rotura o reacción del acrosoma (Flesch et al., 1998; Peña et al., 2016a).

2.2.4.1.3. Mitocondrias.

Están ubicadas en la pieza media del flagelo. Produce ATP por fosforilación oxidativa, la importancia radica en proporcionar la motilidad. Los espermatozoides dependen de la producción de ATP mitocondrial, si no hay un correcto funcionamiento mitocondrial, los espermatozoides están condenados a la muerte. Las mitocondrias de los espermatozoides son indicadores sensibles del estrés que ocurre en las fases de enfriamiento y congelación de las células espermáticas. (Ortega-Ferrusola et al., 2009)

Se utilizan dos sondas para evaluar la integridad mitocondrial uno es el 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianino yodo (JC-1) y el más reciente son los tintes MitoTracker (Garner and Thomas, 1999).

CAPITULO III

CONTRASTACIÓN DE HIPOTESIS.

3.1. Hipótesis.

La calidad espermática del semen congelado de toros reproductores de Cajamarca de diferentes razas evaluados por microscopía y citometría de flujo por imágenes, se encuentran dentro de los estándares recomendados y se relacionan.

3.2. Localización.

El estudio se realizó en setiembre del 2022, en el distrito de Cajamarca y en el laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Los datos meteorológicos de la provincia de Cajamarca son los siguientes¹

Altitud: 2662 msnm

Latitud: 7°9'54" S

Longitud: 78°28'42" W

3.3. Unidad de análisis, población y muestra.

3.3.1. Material biológico.

3.3.1.1. Selección de animales y muestras.

Las dosis de semen analizadas en el presente estudio provienen de toros maduros entre 1.5 a 8 años de edad, se seleccionaron nueve toros en total, tres por cada raza (Holstein, Brown Swiss y Fleckvieh).

¹ Fuente: <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=cajamarca&p=estaciones>

Del lote de semen correspondiente a cada toro, se seleccionaron tres pajuelas por cada ejemplar (27 pajuelas en total) para el análisis de laboratorio. Figura 4.

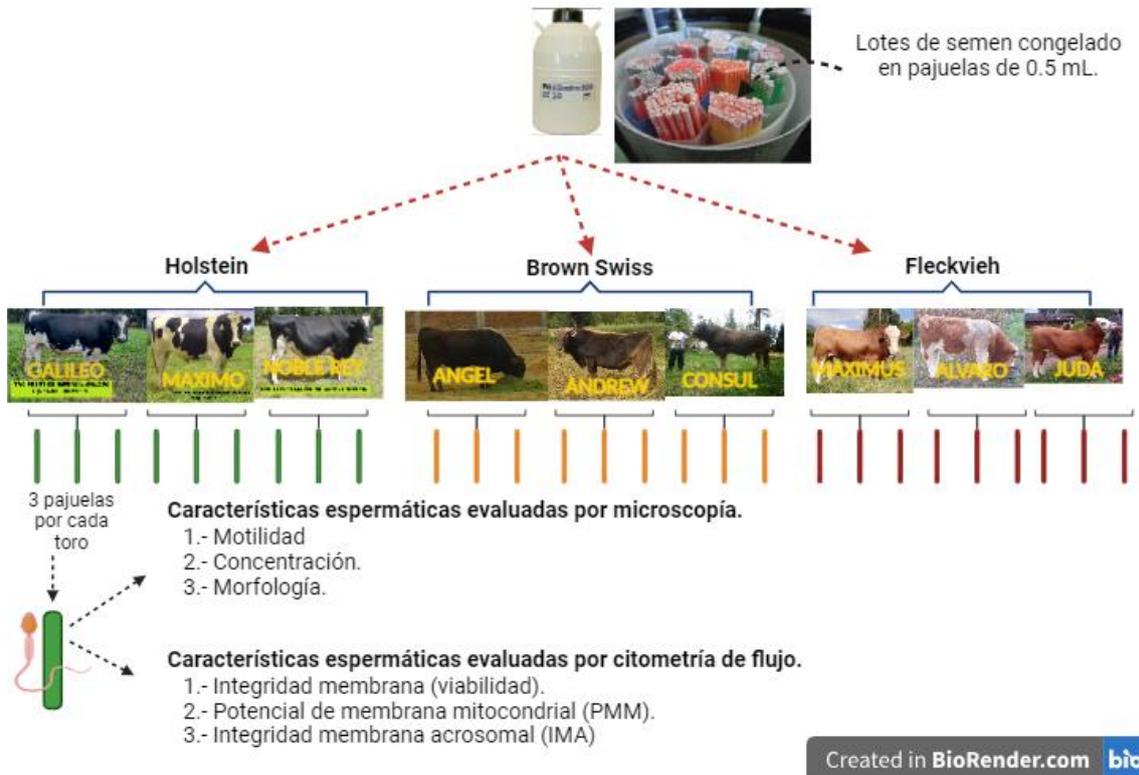


Figura 4. Diseño para la investigación: Se usó tres toros por cada raza, del total de pajuelas almacenadas por cada toro, se tomarán tres pajuelas para realizar la evaluación.

3.3.3.2. Recolección y procesamiento del semen

Las muestras de semen congeladas y evaluadas en el presente estudio, son producto del trabajo regular de colecta de semen a toros en la región Cajamarca.

El semen se colectó en una vagina artificial calentada a 38 °C y una vaca. Se tomaron tres eyaculados por cada sesión de colecta, los eyaculados se analizaron inmediatamente evaluando el volumen, concentración y motilidad con microscopía de contraste de fase. Los eyaculados con un volumen ≥ 2 mL, concentración $\geq 500 \times 10^6$ espermatozoides/mL y motilidad ≥ 70 % se procesaron y congelaron.

El diluyente usado fue Andromed y Triladyl, el semen se envasó en pajuelas de 0.5 mL y se ambientó a 4 °C por 24 horas, la congelación se realizó en una cámara de congelación artesanal de tecnoport con un nivel de nitrógeno de 5 cm. Inmediatamente después, el semen congelado se almacenó en nitrógeno líquido (-196 °C)

3.3.3.3. Preparación del semen antes del análisis.

Se descongelaron tres pajuelas de cada toro en un baño de agua (37 °C, 30 S) y se agruparon en un tubo de laboratorio de 1.5 mL precalentado a 37 °C. las muestras agrupadas se evaluaron con microscopia de contraste de fase y citometría de flujo inmediatamente después de la descongelación.

3.3.3.4. Análisis de semen por microscopía de contraste.

La motilidad de los espermatozoides se evaluó bajo un cubreobjetos (18 x18 mm) sobre un portaobjetos de vidrio tibio mediante microscopía óptica (aumento de 400 x), y la concentración de espermatozoides se evaluó mediante un hemocitómetro

3.3.3.5. Análisis de citometría de flujo.

Cada muestra descongelada se lavó dos veces por centrifugación con PBS a 600 g por 8 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 150 µl de PBS.

3.3.3.5.1. Viabilidad espermática.

La viabilidad espermática se evaluó después del proceso de crio preservación. Cada muestra se lavó dos veces por centrifugación con PBS a 600 x g por 8 minutos, eliminándose el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µl de PBS. Se empleó el LIVE/DEAD® SpermViability Kit (L-7011, Molecular Probes), el cual contiene el fluorocromo SYBR-14 que emite fluorescencia verde como indicador de espermatozoides viables con membrana plasmática intacta y el fluorocromo yoduro de

propidio (PI) que emite fluorescencia roja como indicador de espermatozoides no viables con membrana plasmática dañada. Se tomó 100 µl de muestra después del lavado y se agregó 0.5 µl de solución stock de SYBR-14(20 µM) para obtener una concentración final de 100 nM. Se agregó además 0.5 µl de solución stock de PI (2.4 mM) para llegar a una concentración final de PI de 12 µM y se puso a incubar a 38 °C por 10 minutos. Las evaluaciones se realizaron mediante un citómetro de flujo FlowSight (Amnis,USA) que tiene un sistema analizador de imágenes. Se analizaron 5 000 eventos compatibles con espermatozoides por cada muestra. Para la excitación del SYBR-14 y del PI se utilizará un láser de longitud de onda de 488 nm a una potencia de 15 mW. La emisión de la fluorescencia para el SYBR-14 fue leída utilizando el canal de detección de 505 a 560 nm (Ch02) y la emisión de la fluorescencia para el PI fue leída utilizando el canal de detección de 642 a 740 nm (Ch05). Dado que el citómetro de flujo posee un sistema analizador de imágenes, se observaron imágenes de espermatozoides vivos marcados con SYBR-14 y muertos marcados con PI (Juárez and Santiani, 2019)

3.3.3.5.2. Integridad del acrosoma

El estado del acrosoma se evaluó usando la sonda: aglutinina de *Pisum sativum* marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA): Se tomó 100 µl de cada muestra y se incubó por 8 minutos a 38 °C con 2.5 µl de solución Stock de FITC-PSA (100 µg/ml) para obtener una concentración de 2.5 µg/ml de FITC-PSA. Se adicionó 0.5 µl de solución Stock de PI (1 mg/ml) para llegar a una concentración final de 5 µg/ml. Se utilizó el citómetro de flujo Flow Sight (Amnis, Seattle, WA, EE.UU.), equipado con un sistema analizador de imágenes. El software que se usó fue INSPIRE® v.100.3.218.0 (Amnis, Seattle, EEUU) y el software para analizar los datos fue IDEAS® v.6.2 (Amnis, Seattle, EEUU). Se midieron 10 mil eventos compatibles con espermatozoides según su tamaño y proporción largo/ancho. Los eventos fueron excitados con un láser de longitud de onda

de 488nm y potencia de 20 mW. La evaluación de la intensidad de fluorescencia de FITC-PSA se realizó utilizando un canal de detección de 505 a 560 nm (Ch02), mientras que la intensidad de fluorescencia de PI se realizará utilizando un canal de detección de 642 a 740 nm (Ch05). Adicionalmente, en cada grupo se registraron imágenes para comprobar si las lectinas marcan la región acrosomal. Los espermatozoides fueron clasificados en cuatro poblaciones celulares: a) espermatozoides vivos con integridad acrosomal (FITC negativo, PI negativo), b) espermatozoides vivos con daño acrosomal (FITC positivo, PI negativo), c) espermatozoides muertos con integridad acrosomal (FITC negativo, PI positivo) y d) espermatozoides muertos con daño acrosomal (FITC positivo, PI positivo) (Ugarelli et al., 2017)

3.3.3.5.3. Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)

Se preparó una solución stock de Mito Tracker Deep Red, para lo cual se diluye 50 µg en 92 µl de DMSO para llegar a una concentración de 1 mM. Se procede a homogenizar y se preparara alícuotas de 2 µl guardándolas en congelación. Luego se prepara una solución de trabajo para lo cual se diluye 2 µl de solución stock de Mito Tracker Deep Red con 100 µl de PBS, para llegar a una concentración de 20 µM. Se toma 100 µl de muestra después del lavado y se agrega 0.5 µl de solución de trabajo de Mito Tracker Deep Red 633(20 µM) para obtener una concentración final de 100 nM. Se incubará durante 10 min a 38 °C en oscuridad. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro de flujo Flow Sight (Amnis) equipado con un sistema analizador de imágenes. Se analizarán diez mil espermatozoides por cada muestra. Para la excitación del Mito Tracker Deep Red se usará un láser de longitud de onda de 642 nm y la emisión de la fluorescencia se leerá utilizando el canal de detección 11 (Ch-11): (642-740 nm). Los eventos se presentarán utilizando un gráfico tipo histograma, en donde el eje «X» mide la intensidad de fluorescencia del Ch-11 y en el eje «Y» la frecuencia de los eventos. Se

considera espermatozoides con actividad mitocondrial a aquellos que presentaron fluorescencia roja. Los resultados se expresarán en porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial (Allauca et al., 2019)

3.4. Análisis estadístico.

Se realizó análisis mediante estadística descriptiva, de correlación de Spearman, prueba de Kruskal y Wallis a las variables que no mostraron normalidad y ANOVA de un factor a las variables con normalidad, entre las variables determinadas por citometría de flujo y las variables determinadas por microscopía óptica.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Evaluación de características espermáticas por microscópica.

En la tabla 1 se presentan los datos estadísticos descriptivos obtenidos al evaluar las características espermáticas por microscopía (motilidad, concentración y morfología) y características evaluadas por citometría de flujo: Viabilidad espermática (SYBR-14), Potencial de Membrana Mitocondrial Alto (PMM) e Integridad de Membrana Acrosomal (IMA). Resaltando la alta concentración espermática.

Tabla 1. Características espermáticas evaluadas por microscopía y por citometría de flujo en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca - 2022 (n = 27)

	Evaluación por microscopía			Evaluación por citometría de flujo.		
	Motilidad (%)	Concentración (millones)	Morfología Normal (%)	Viabilidad (%)	PMM (%)	IMA (%)
Media	40.37	89.07	81.00	17.50	22.67	19.24
Mediana	40.00	88.00	80.25	17.50	21.80	19.50
SD	18.29	39.51	5.95	7.79	8.96	8.15
Min	10	32	66.00	3.41	8.22	4.31
Max	70	188	92.00	41.20	37.10	45.90
Rango	60	156	26	37.79	28.88	41.59
CV%	45	44.36	7.34	44.51	39.52	42.36

El proceso de congelación y descongelación provoca cambios estructurales y moleculares en los espermatozoides, reduciendo la capacidad de fertilización y posterior desarrollo embrionario.

El proceso de crío preservación provoca una reducción en la motilidad y pérdida de la vitalidad en el 50 % de los espermatozoides. El valor mínimo aceptable de la motilidad post descongelación debe ser 30 %, además se requiere 40 % de espermatozoides con la membrana celular intacta (viabiles). (Bollwein and Malama, 2023). Los hallazgos del presente estudio mostraron que la motilidad osciló entre 10 y 70 %, con una mediana de 40 ± 19.19 % (Tabla 1, Figura 5). El 75 % de los valores se encuentran sobre el valor mínimo aceptable del 30 % y solamente un 25 % de los valores son inferiores a este. En el bigote inferior se aprecia mayor variación de los datos, comparado con el superior. Además, se observa un intervalo de confianza entre 30 y 50 %. (Figura 2). Los valores de motilidad del presente trabajo son inferiores a los reportados por (Khalil et al., 2018; Morrell et al., 2018b), quienes encontraron valores de 50.8 ± 2.7 , 64 ± 14 y 59 ± 14 en toros de razas cárnicas y de leche respectivamente. Pero guardan relación con el 43.6 % de motilidad reportado por (Varela et al., 2020a).

La concentración media fue de 89.07 ± 39.51 millones de espermatozoides (tabla 1, figura 5), este resultado es similar con los obtenidos por (Morrell et al., 2018b), quienes informaron una concentración de 88 ± 20 millones. Pero superior al estándar mínimo aceptable post descongelación de 20 millones y a los mostrados por (DeJarnette et al., 2021), quienes indican que el promedio de la concentración espermática post congelación en pajuelas de la empresa Select Sires fue de 21.9 ± 0.012 millones.

Las concentraciones altas de espermatozoides tienen efectos positivos porque mejora las probabilidades de concepción, al incrementarse el número de espermatozoides normales para alcanzar el umbral mínimo requerido para la concepción. (Saacke, 2008).

Las características espermáticas que son compensadas con la concentración es la integridad de membrana y el potencial de membrana mitocondrial; en cambio la integridad del acrosoma no es compensable (Kastelic, 2013).

La alta concentración espermática puede incrementar los niveles de estrés oxidativo, con efectos negativos en la viabilidad y motilidad celular (Murphy et al., 2013).

La morfología normal fue de 81 ± 5.95 % (tabla 1, figura 5), los mismos que guardan relación con los valores reportados por (Morrell et al., 2018b), quienes observaron 76 ± 8 % y 87 ± 6 % ($p < 0.05$) de espermatozoides con morfología normal en toros de carne y leche respectivamente. De igual manera con los datos encontrados por (Varela et al., 2020a), quienes informaron 81 ± 22.2 % de espermatozoides con morfología normal, asimismo con el 70 % reportado por (Albert D Barth, 2006; Thundathil et al., 2016b). No existió correlación entre las variables evaluadas de manera convencional.

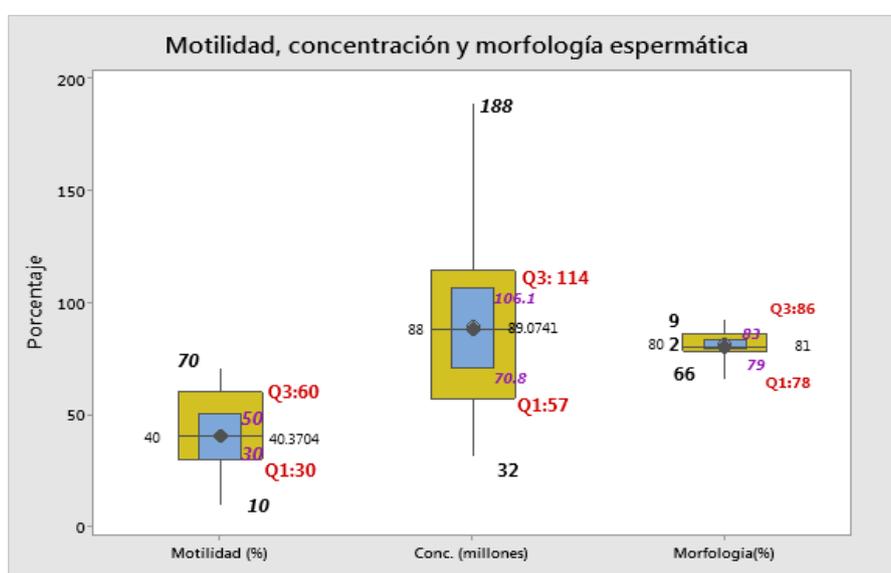


Figura 5. Caja de bigotes de motilidad, concentración y morfología de espermatozoides evaluados en 27 muestras de semen congelado de toros reproductores de Cajamarca - 2022.

4.2. Evaluación de características espermáticas por citometría de flujo.

4.2.1. Viabilidad espermática mediante SYBR-14 y PI

La prueba de Shapiro Wilk indica que existe normalidad en la viabilidad espermática (SYBR-14) (Anexo 3), presentando porcentajes similares entre la media y la mediana, con un coeficiente de variación de 44.5 % y datos muy dispersos (Tabla 1 y Figura 6). Apreciándose que el 75 % espermatozoides van desde 12.3 al 27.9 %, el 25 % entre 3.41 a 12.3 % de integridad de la membrana plasmática, con un intervalo de 14.5 a 20.71 %. Presentando un valor atípico que corresponde al toro Morden de raza Brown Swiss con 41.20 %.

El 17.5 ± 7.79 % de los espermatozoides tenían la membrana intacta (vivos) y el 82.49 % tenían la membrana lesionada (muertos) (Tabla 1), valores inferiores a los reportados por (Morrell et al., 2018b), quienes encontraron valores de 40 ± 11 % versus 46 ± 8 % en toros de carne y leche respectivamente y 44.6 ± 15.2 % mencionados por (Varela et al., 2020a), igualmente menor al 32.30 ± 9.57 % de la viabilidad de espermatozoides de alpacas recuperados del epidídimo reportados por (Juárez and Santiani, 2019). Existió una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) al comparar los porcentajes de la viabilidad espermática entre las tres razas, observándose un menor porcentaje en la Raza Holstein (11.50 ± 5.32 %) comparadas con la raza Brown Swiss (20.49 ± 9.57 %) y la Fleckvieh (20.52 ± 4.05 %) (Tabla 2)

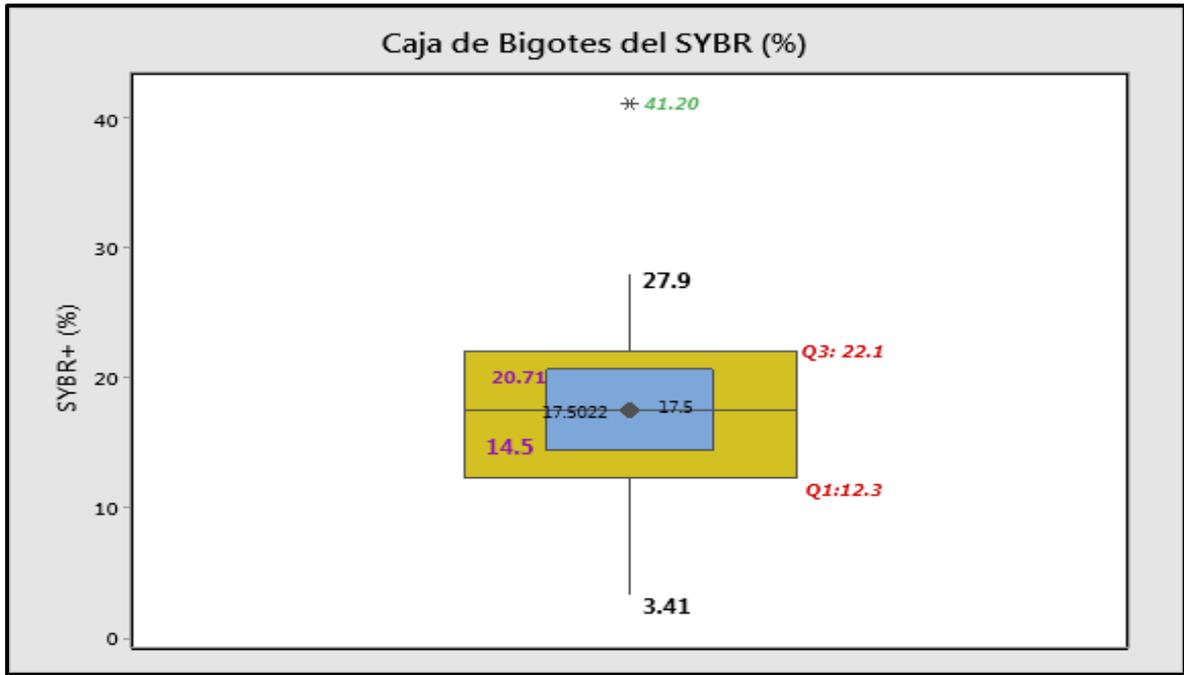


Figura 6. Caja de Bigotes de Viabilidad espermática (SYBR-14) evaluados por citometría de flujo en 27 muestras de semen congelado de toros reproductores de Cajamarca - 2022.

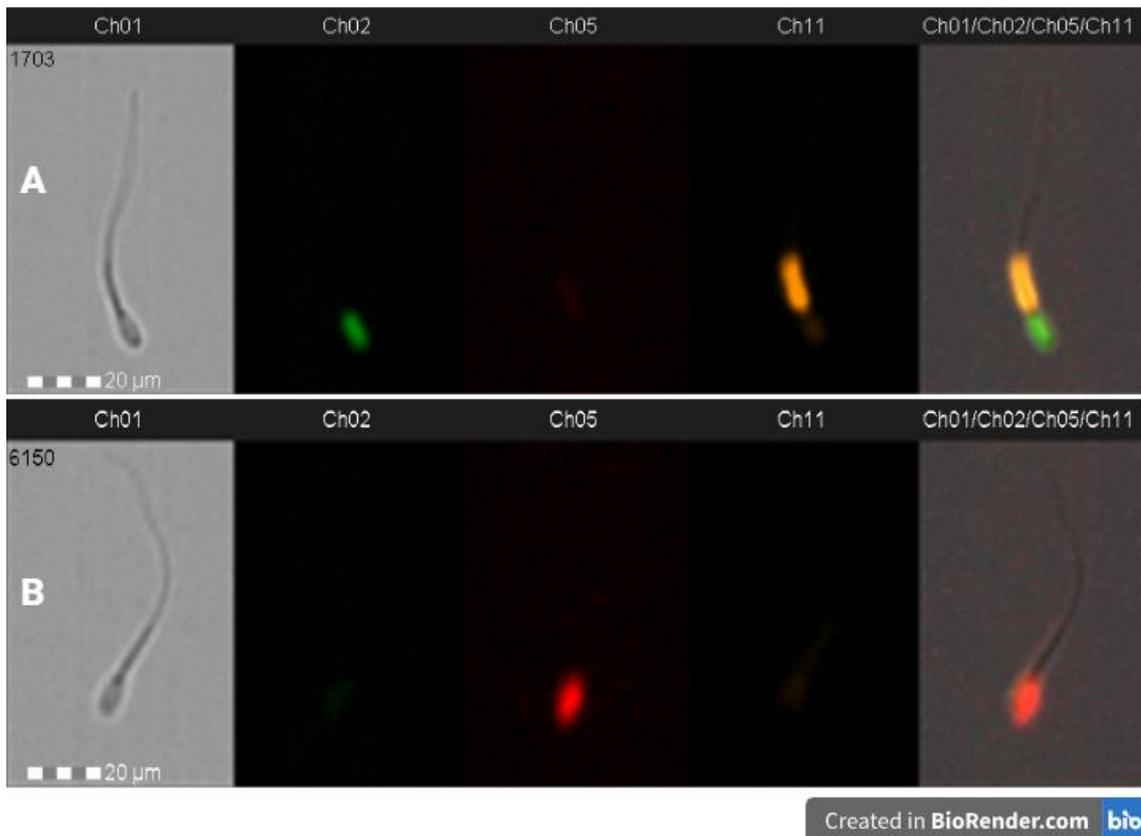


Figura 7. Espermatozoides de toros reproductores de Cajamarca analizados mediante citometría de flujo por imágenes utilizando los fluorocromos SYBR-14

e yoduro de propidio (IP) observados en campo claro (Ch01), con fluorescencia (Ch02/Ch05/Ch11), combinación de campo claro y fluorescencia (Ch01/Ch02/Ch05/Ch11). (A) espermatozoide vivo emitiendo fluorescencia verde por el SYBR-14. (B) espermatozoide muerto emitiendo fluorescencia roja por el PI.

4.2.2. Potencial de la membrana mitocondrial.

El porcentaje de potencial de membrana tiene una distribución normal a la prueba de Shapiro Wilk (Anexo 5), presentando un coeficiente de variación elevado (39.51%), debido a los altos valores de dispersión (8.22-37.10), con un rango de 28.88 (Figura 8), registrando el 75 % del potencial de la membrana mitocondrial se encuentra entre el 13.4 al 37.1 %; el 25 % se encuentra entre 8.22 al 13.4 %; con un intervalo de 17.98 a 31.69 %, demostrando que los resultados no fueron uniformes.

La media del potencial de membrana mitocondrial alto (mitocondrias activas) fue de 22.67 ± 8.96 %. (Tabla 1), superior a los reportados (Varela et al., 2020a), quienes encontraron una media de 18.3 ± 15.3 %. Pero menor a los datos reportados por (Morrell et al., 2018b), quienes informaron 36 ± 10 % y 52 ± 12 % de espermatozoides con alta actividad respiratoria en toros de carne y leche respectivamente. El PMM comparado entre razas dio una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) siendo menor el potencial de membrana mitocondrial la de la raza Holstein (16.01 ± 8.25 %) comparado con la Fleckvieh (28.19 ± 5.28 %) y la Brown Swiss (20.80 ± 8.9 %), siendo éstas dos últimas similares (Tabla 2).

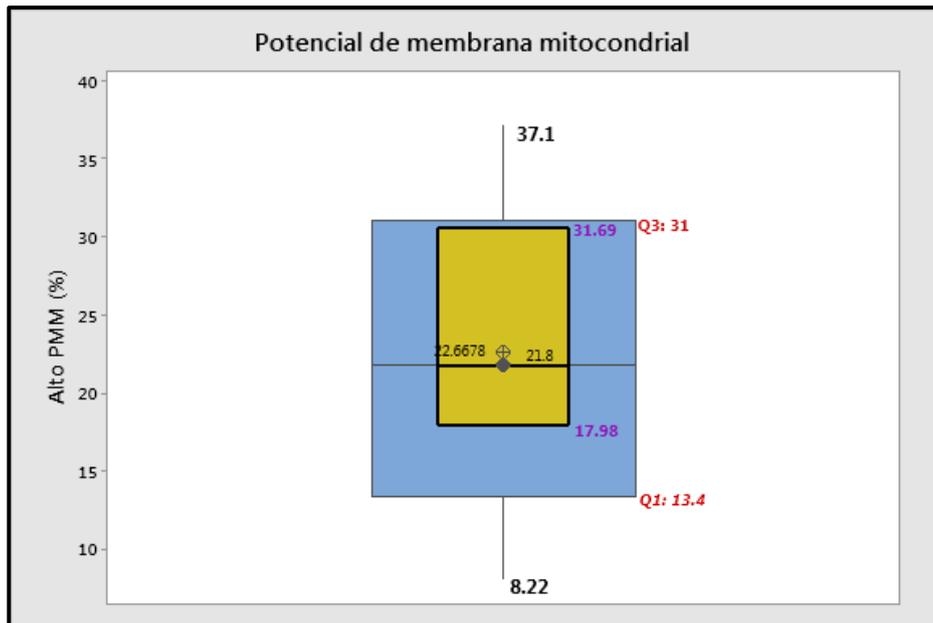


Figura 8. Caja de Bigotes del Potencial de la Membrana Mitocondrial evaluados por cartometría en 27 muestras de semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022.

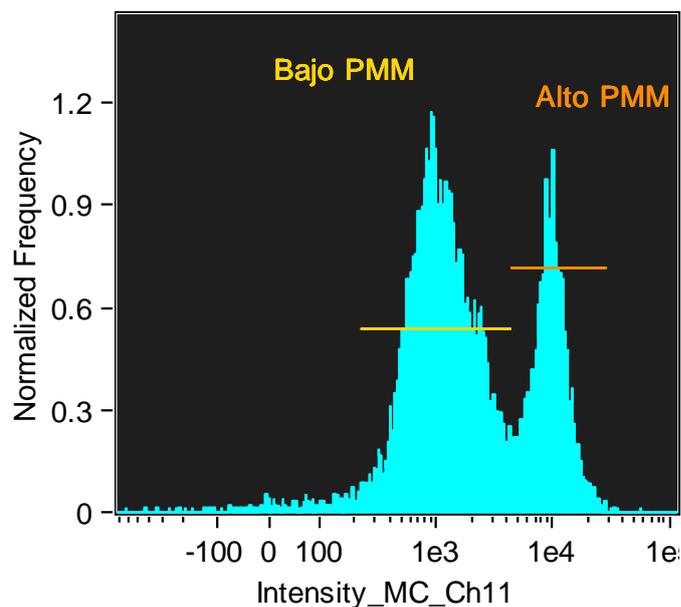


Figura 9. Análisis de potencial de membrana mitocondrial (PMM). Muestra espermática con Mito Tracker Deep Red FM; PMM bajo y PMM alto.

4.2.3. Integridad de la membrana acrosomal.

En lo relacionado a integridad de la membrana acrosomal (Tabla 1, anexo 4 y figura 9), nos indican que no existió normalidad, registrando el 75 % de valores entre 15.6 al 27 %, con datos menos dispersos, en cambio el 25% se encuentran entre el 5.62 al 15.6 %, con mayor dispersión, concluyendo que la mayor dispersión se encuentra en el primer cuartil. En la figura 9 se observa un valor superior atípico que corresponde al toro Andrew de raza Bown Swiss con un porcentaje de 45.9 %, existiendo también valor atípico por debajo del primer cuartil que corresponden al toro Galileo (4.31 %), de la raza Holstein.

La media fue 19.24 ± 8.15 %, inferior a los datos proporcionados por (Morrell et al., 2018b), quienes reportaron valores de 59 ± 12 versus 52 ± 8 ; $P < 0.05$, en toros de carne y leche respectivamente.

Existe una relación directamente proporcional ($r:0.791$; $p<0.01$) entre alto PMM y SYBR; entre IMA con SYBR ($r:0.647$; $p<0.01$) e IMA con Alto PMM ($r: 0.600$; $P<0.01$).

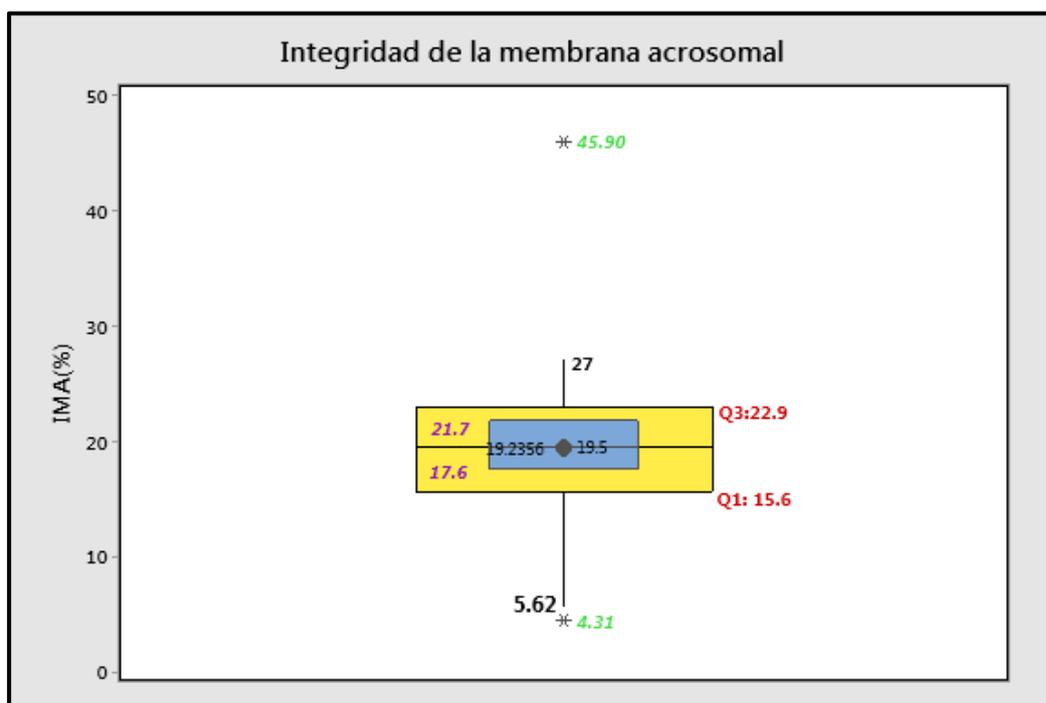


Figura 10. Caja de Bigotes del IMA evaluados por citometría en 27 muestras de semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022.

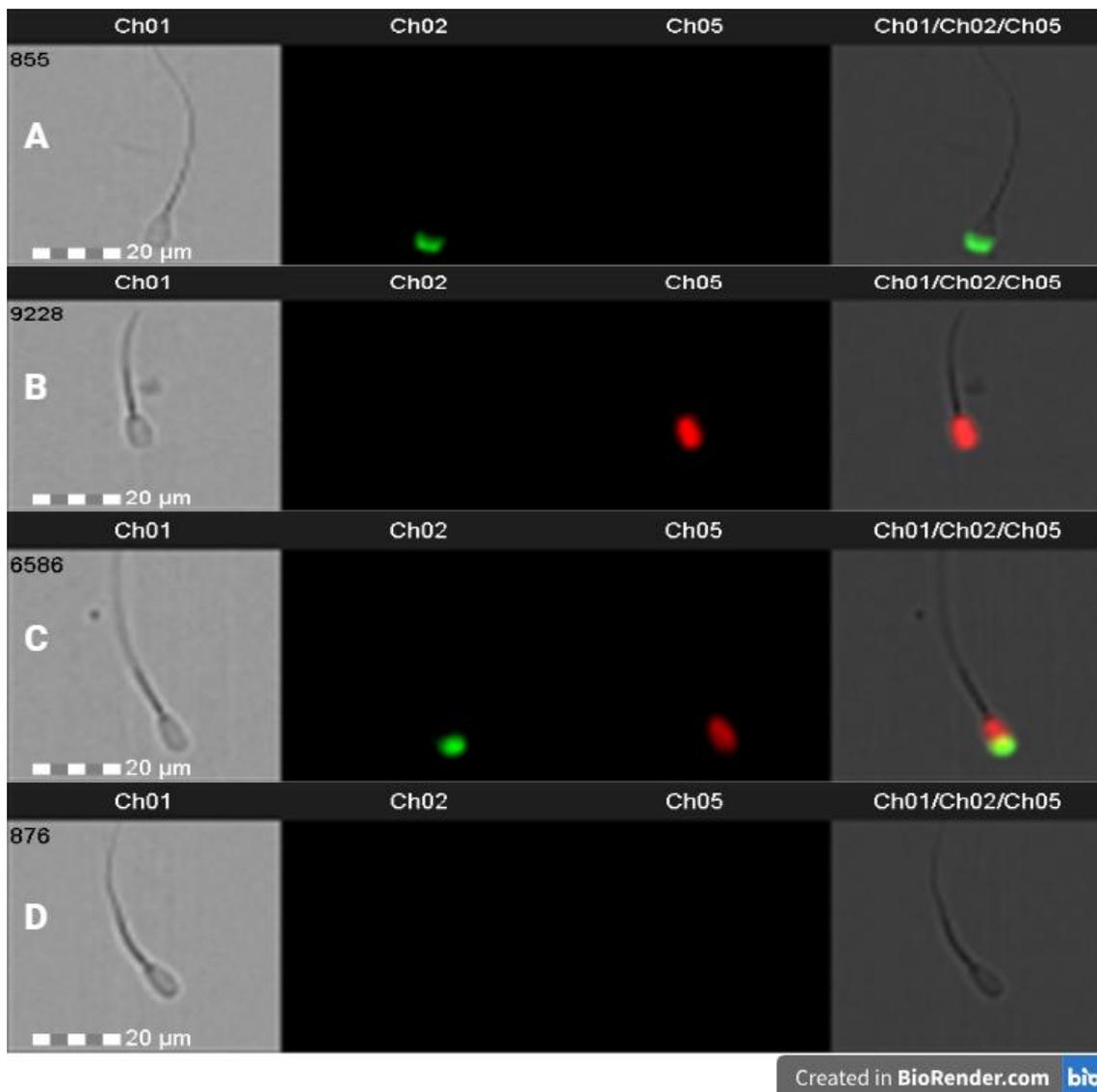


Figura 11. Patrones de espermatozoides de toros reproductores de Cajamarca incubados con isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) y yoduro de propidio (PI), observados en campo claro (Ch01), combinación de campo claro y fluorescencia (Ch01/Ch02/Ch05) y con fluorescencia (Ch02/Ch05). A) Espermatozoide vivo con reacción acrosomal (PSA+ y PI-). B) Espermatozoide muerto sin reacción acrosomal (PSA- y PI+). C) Espermatozoide muerto con reacción acrosomal (PSA+ y PI+). D) Espermatozoide vivo sin reacción acrosomal (PSA- y PI-)

No existió diferencia significativa ($P>0.05$) al realizar la prueba de Kruskal y Wallis en el porcentaje de motilidad y el porcentaje la morfología, así como al ANOVA en la concentración espermática entre los toros utilizados.

Existió una diferencia altamente significativa ($p<0.01$) al comparar los porcentajes de la viabilidad espermática entre las tres razas (tabla 2, anexo7). observándose un menor porcentaje en la Raza Holstein (11.50 ± 5.32) comparadas con la raza Brown Swiss (20.49 ± 9.57) y la Fleckvieh (20.52 ± 4.05). El PMM comparado entre razas dio una diferencia significativa ($p<0.05$ – Kruskal y Wallis) siendo menor el potencial de membrana mitocondrial la de la raza Holstein (13.70) comparado con la Fleckvieh (30.60) (Tabla 2, anexo 8). La integridad de la membrana acrosomal entre las tres razas fueron similares ($P>0.05$) (Tabla 3), al realizar la comparación de la IMA entre razas, a la prueba de Kruskal Wallis, no existió diferencia (Tabla 2)

Tabla 2. Vitalidad espermática (SYBR-14), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridad de membrana acrosomal (IMA) entre razas, evaluados por citometría en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca - 2022.

Raza	n	Media (SYBR-14) %	Mediana (PMM) %	Mediana (IMA) %
Fleckvieh	9	20.52 ± 4.05^a	30.60^a	21.30^a
Brown Swiss	9	20.49 ± 9.57^a	22.90^{ab}	19.50^a
Holstein	9	11.50 ± 5.32^b	13.70^b	14.60^a

Donde: a,b Letras diferentes en una misma columna indican diferencia significativa ($p<0.05$ - Kruskal y Wallis).

Tabla 3. Viabilidad espermática (SYBR-14), potencial de membrana mitocondrial (PMM) e integridad de membrana acrosomal (IMA) según el dilutor seminal, evaluados por citometría en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca -2022

Dilutor del Semen	n	(SYBR) Media (%)	(PMM) Media (%)	(IMA) Mediana (%)
Triladyl	14	18.00±9.82 a	24.62±10.39 a	22.10 a
Andromed	13	16.97±5.13 a	20.57±6.90 a	17.80 a

Al comparar el dilutor del semen, para determinar si influye sobre la vitalidad espermática, potencial de membrana y de la integridad de la membrana acrosomal, al análisis de variancia (viabilidad y potencial de membrana) y a la prueba de Krus Kall y Wallis, no mostraron diferencia estadística significativa ($P > 0.05$).

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre las características espermáticas evaluadas por microscopía y por citometría de flujo en semen congelado de toros reproductores de Cajamarca - 2022.

Correlaciones		Motilidad	Concentración	Morfología	Viabilidad (SYBR)	PMM	IMA
Motilidad	r	1	-0.012	-0.007	0.112	-0.067	0.115
	p		0.953	0.974	0.579	0.738	0.440
Concentración	r		1	0.275	0.188	-0.127	-0.076
	p			0.165	0.348	0.527	0.707
Morfología	r			1	-0,167	-0.295	-0,292
	p				0.404	0.135	0.139
Viabilidad (SYBR)	r				1	,791**	,647**
	p					0.000	0.000
PMM	r					1	,600**
	p						0.000
IMA	r						1
	p						

No existió correlación entre las variables evaluadas por microscopía (motilidad, concentración y morfología normal), al igual que la motilidad, concentración y morfología con la viabilidad (SYBR), PMM e IMA.

El análisis de correlación Rho de Spearman indica que existe una relación directamente proporcional (r:0.791;p<0.01) entre viabilidad con alto PMM; (r:0.647; p<0.01) entre viabilidad con IMA y (r: 0.600: P<0.01) entre PMM con IMA.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Después de evaluar las variables espermáticas mediante microscopía y citometría de flujo, se llegó a las siguientes conclusiones:

Las medias de motilidad y morfología espermática fueron: 40.37 ± 19.79 , y 81 ± 5.95 % cuyos valores están dentro de los valores normales para comercialización, rescatando la concentración espermática de 89.07 ± 39.51 %, cuyo valor es cuatro veces mayor al umbral mínimo aceptable.

No existió correlación entre las variables evaluadas por microscopía (motilidad, concentración y morfología) con las variables evaluadas con citometría de flujo de imágenes (viabilidad, PMM e IMA).

Las medias de viabilidad, potencial de membrana mitocondrial alto e integridad de membrana acrosomal fueron: 17.50 ± 7.79 , 22.67 ± 8.96 y 19.24 ± 8.15 % respectivamente, cuyos valores son inferiores a otros trabajos realizados.

Se observaron relaciones directamente proporcional y altamente significativas entre viabilidad y PMM ($r:0.791$); entre viabilidad con IMA ($r:0.647$) y PMM con IMA ($r: 0.600$; $P<0.01$).

Existió una diferencia altamente significativa ($p<0.01$) al comparar los porcentajes de la viabilidad espermática entre las tres razas, raza Holstein (11.50 ± 5.32 %), raza Brown Swiss (20.49 ± 9.57 %) y Fleckvieh (20.52 ± 4.05 %).

El PMM entre razas dio una diferencia altamente significativa ($p<0.01$) siendo menor en Holstein (16.01 ± 8.25 %), seguido en Brown Swiss (20.80 ± 8.9 %) y Fleckvieh (28.19 ± 5.28 %).

La IMA entre las tres razas fueron similares ($P>0.05$).

Se recomienda realizar otros trabajos de investigación aplicando citometría de flujo con la finalidad de tener más datos y poder contribuir a mejorar los indicadores de calidad espermática mediante esta técnica.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Akhoondi, M., Oldenhof, H., Stoll, C., Sieme, H., Wolkers, W.F., 2011. Membrane hydraulic permeability changes during cooling of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808, 642–648.
- Allauca, P., Ugarelli, A., Santiani, A., 2019. Determination of mitochondrial membrane potential by flow cytometry during the cryopreservation process of epididymal alpaca spermatozoa. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 30, 288–298.
- Al-Makhzoomi, A., Lundeheim, N., Håård, M., Rodríguez-Martínez, H., 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 70, 682–691.
- Arieta Román, R.D.J., Fernández Figueroa, J.A., Menchaca Peña, J., 2014. Métodos de extracción de semen bovino. *Revista Electronica de Veterinaria* 15, 30–37.
- Auger, J., 2018. Spermatozoa and sperm structure. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, pp. 62–67.
- Barth, Albert D., 2006. Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull, Second Edi. ed, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology: Second Edition*. Elsevier Inc.
- Barth, Albert D, 2006. Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* Second Edi. ed, 228–240.
- Birck, A., Christensen, P., Labouriau, R., Pedersen, J., Borchersen, S., 2010. In vitro induction of the acrosome reaction in bull sperm and the relationship to field fertility using low-dose inseminations. *Theriogenology* 73, 1180–1191.
- Bollwein, H., Malama, E., 2023. Review: Evaluation of bull fertility. Functional and molecular approaches. *animal* 17, 100795.
- Christensen, P., Labouriau, R., Birck, A., Boe-Hansen, G.B., Pedersen, J., Borchersen, S., 2011. Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. *J Dairy Sci* 94, 1744–1754.

- Contreras, M.J., Arias, M.E., Fuentes, F., Muñoz, E., Bernecic, N., Fair, S., Felmer, R., 2023. Cellular and Molecular Consequences of Stallion Sperm Cryopreservation: Recent Approaches to Improve Sperm Survival. *J Equine Vet Sci* 126, 104499.
- DeJarnette, J.M., Harstine, B.R., McDonald, K., Marshall, C.E., 2021. Commercial application of flow cytometry for evaluating bull sperm. *Anim Reprod Sci* 106838.
- Eddy, E.M., 2006. *The Spermatozoon* 3, 3–54.
- Flesch, F.M., Gadella, B.M., 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization, *Biochimica et Biophysica. Utrech. The Netherlands*.
- Flesch, F.M., Voorhout, W.F., Colenbrander, B., van Golde, L.M.G., Gadella, B.M., 1998. Use of Lectins to Characterize Plasma Membrane Preparations from Boar Spermatozoa: A Novel Technique for Monitoring Membrane Purity and Quantity 1, *BIOLOGY OF REPRODUCTION*.
- Foutouhi, A., Meyers, S., 2022. Comparative oxidative metabolism in mammalian sperm. *Anim Reprod Sci* 247, 107095.
- Garner, D.L., Thomas, C.A., 1999. Organelle-Specific Probe JC-1 Identifies Membrane Potential Differences in the Mitochondrial Function of Bovine Sperm.
- Geoffrey H., Arthur., 2001. Fertility and infertility in male animals. In: *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. W.B. Saunders, pp. 695–750.
- Gómez, V., Migliorisi, L., 2002. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Sitio Argentino de produccion animal* 1, 1–9.
- Gómez, V., Migliorisi, L., 2015. Protocolo para la evaluacin de semen en rumiantes. *Unlp* 1, 4–9.
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H.M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., Shahverdi, A., 2018. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod Biomed Online* 37, 327–339.
- Hirose, M., Honda, A., Fulka, H., Tamura-Nakano, M., Matoba, S., Tomishima, T., Mochida, K., Hasegawa, A., Nagashima, K., Inoue, K., Ohtsuka, M., Baba, T.,

- Yanagimachi, R., Ogura, A., 2020. Acrosin is essential for sperm penetration through the zona pellucida in hamsters. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 117 (5), 2513–2518.
- Juárez, J., Santiani, A., 2019. Sperm viability percentage by flow cytometry during the cryopreservation process in spermatozoa obtained from alpaca epididymis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 30, 1175–1183.
- Kastelic, J.P., 2013. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. *Animal Frontiers* 3, 20–25.
- Khalil, W.A., El-Harairy, M.A., Zeidan, A.E.B., Hassan, M.A.E., Mohey-Elsaeed, O., 2018. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *Int J Vet Sci Med* 6, S49–S56.
- Kumar Yata, V., Kumar Gangwar, D., Sharma, V., Kumar Dubey, S., Kumar Yadav, S., Choudhary, S., Kumar, S., Kumar Mohanty, T., Kumar Mohanty, A., 2020. Semen analysis and sperm characteristics of Karan Fries cattle. *Anim Reprod Sci.*
- Leahy, T., Gadella, B.M., 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 142, 759–778.
- Leung, M.R., Zeng, J., Wang, X., Roelofs, M.C., Huang, W., Zenezini Chiozzi, R., Hevler, J.F., Heck, A.J.R., Dutcher, S.K., Brown, A., Zhang, R., Zeev-Ben-Mordehai, T., 2023. Structural specializations of the sperm tail. *Cell* 186, 2880-2896.e17.
- Love, C.C., 2016. Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* 32, 531–546.
- MAZUR, P., 1963. Kinetics of Water Loss From Cells At Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 47, 347–369.
- Moraes, C.R., Meyers, S., 2018. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Anim Reprod Sci.*
- Morrell, J.M., Valeanu, A.S., Lundeheim, N., Johannisson, A., 2018a. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Vet Scand* 60.
- Morrell, J.M., Valeanu, A.S., Lundeheim, N., Johannisson, A., 2018b. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta Vet Scand* 60.

- Murphy, C., Fahey, A.G., Shafat, A., Fair, S., 2013. Reducing sperm concentration is critical to limiting the oxidative stress challenge in liquid bull semen. *J Dairy Sci* 96, 4447–4454.
- Nguyen, H.T., Do, S.Q., Kobayashi, H., Wakai, T., Funahashi, H., 2023. Negative correlations of mitochondrial DNA copy number in commercial frozen bull spermatozoa with the motility parameters after thawing. *Theriogenology* 210, 154–161.
- Okada, Y., 2022. Sperm chromatin structure: Insights from in vitro to in situ experiments. *Curr Opin Cell Biol*.
- Olivera, M., Agr, S., Ruiz, T., Tarazona, A., Giraldo, C., 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización, *Rev Col Cienc Pec*.
- Ortega-Ferrusola, C., Macías García, B., Gallardo-Bolaños, J.M., González-Fernández, L., Rodríguez-Martínez, H., Tapia, J.A., Peña, F.J., 2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 114, 393–403.
- Parkinson, Timothy J; Morrell, J.M., 2019. Artificial Insemination. In: *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. W.B. Saunders, pp. 746–777.
- Pegg, D., Kleinhans, F., 2016. In memoriam Peter Mazur – Cryobiologist. *Cryobiology* 72, 83–85.
- Peña, F.J., Martín Muñoz, P., Ortega Ferrusola, C., 2016a. Flow Cytometry Probes to Evaluate Stallion Spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 43, S23–S28.
- Peña, F.J., Ortega Ferrusola, C., Martín Muñoz, P., 2016b. New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology*.
- Rickard, J.P., Pool, K.R., Druart, X., de Graaf, S.P., 2019. The fate of spermatozoa in the female reproductive tract: A comparative review. *Theriogenology*.
- Rothmann, S.A., Bort, A.M., 2018. Sperm morphology, Second Edi. ed, *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier.
- Saacke, R.G., 2008. Sperm morphology: Its relevance to compensable and un-compensable traits in semen. *Theriogenology* 70, 473–478.

- Sieme, H., 2009. Semen Evaluation. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination* 57–74.
- Sieme, H., Oldenhof, H., Wolkers, W.F., 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci* 169, 2–5.
- sieme, H., Oldenhof, Harriette., 2015. Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock. Wolkers W., Oldenhof H. (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* 1257, 477–488.
- Silva, P.F.N., Gadella, B.M., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958–978.
- Tecele, E., Gagneux, P., 2015a. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol Reprod Dev*.
- Tecele, E., Gagneux, P., 2015b. Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx. *Mol Reprod Dev* 82, 635–650.
- Thomas, C.A., Garner, D.L., Dejarnette, M., Marshall, C.E., 1997. Fluorometric Assessments of Acrosomal Integrity and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa, *BIOLOGY OF REPRODUCTION*.
- Thundathil, J.C., Dance, A.L., Kastelic, J.P., 2016a. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology* 86, 397–405.
- Thundathil, J.C., Dance, A.L., Kastelic, J.P., 2016b. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology*.
- Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S., Santiani, A., 2017. Evaluation of acrosome integrity in epididymal alpaca sperm by flow cytometry. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 28, 130–140.
- Utt, M.D., 2016. Prediction of bull fertility. *Anim Reprod Sci* 169, 37–44.
- Varela, E., Rojas, M., Restrepo, G., 2020a. Association between conventional and computerized sperm quality parameters with flow cytometric evaluation of frozen bovine semen. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* 31.
- Varela, E., Rojas, M., Restrepo, G., 2020b. Asociación entre parámetros convencionales y computarizados de calidad seminal con la evaluación por

citometría de flujo de semen bovino congelado. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 31, e19023.

Yániz, J.L., Soler, C., Santolaria, P., 2015. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Anim Reprod Sci* 156, 1–12.

ANEXOS

Anexo 1: Análisis de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de Motilidad, concentración espermática y morfología (normales)

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
Motilidad %	0,914	27	0,029
Concentración (millones)	0,956	27	0,302
Morfología % normales	0,971	27	0,623

Anexo 2: Prueba de valores atípicos: Motilidad (%), Concentración (millones), Morfología (% normales)

Método

Hipótesis nula Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal

Hipótesis alterna El valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico

Nivel de $\alpha = 0.05$

significancia

Prueba de Grubbs

Variable	N	Media	CV%	Mín.	Máx.	G	P
Motilidad. (%)	27	40.37±18.29	45.30	10.00	70.00	1.66	1.000
Concentración (millones)	27	89.07±39.51	44.35	32.00	188.00	2.50	0.212
Morfología. (% Normales)	27	81.00±5.95	7.34	66.00	92.00	2.52	0.199

* NOTA * No hay valor atípico en el nivel de significancia de 5%

Anexo 3: Análisis de Shapiro-Wilks (modificado) para determinar la normalidad de SYBR + (%) y PI+ (%)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
SYBR+(%)	27	17.50	7.79	0.96	0.6537
PI+ (%)	27	82.49	7.79	0.96	0.6577

Acceptamos la hipótesis nula indicamos que las variables de SYBR Y PI tienen una distribución normal.

Anexo 4: Prueba de valores atípicos: SYBR+ (%), PMM Alto (%), IMA(%), PI+ (%)

Método

Hipótesis nula Todos los valores de los datos provienen de la misma población normal

Hipótesis alterna El valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Prueba de Grubbs

Variable	N	Media	Mín.	Máx.	G	P
SYBR+ (%)	27	17.50±7.79	3.41	41.20	3.04	0.021
PMM Alto (%)	27	22.67±8.96	8.22	37.10	1.61	1.000
IMA (%)	27	19.24±8.15	4.31	45.90	3.27	0.006
PI+ (%)	27	82.49±7.79	58.80	96.60	3.04	0.021

Anexo 5: Análisis de Shapiro-Wilks modificado para determinar la normalidad de Potencial de la Membrana Mitocondrial

Variable	n	Media	D.E.	W*	P (Unilateral D)
IMA (%)	27	19.24	8.15	0.91	0.07
Alto PMM (%)	27	22.67	8.96	0.89	0.03
SYBR+ (%)	27	17.50	7.79	0.96	0.65

Aceptamos la hipótesis nula indicamos que las variables de en PMM Alto (%). Tiene una distribución normal

Rechazamos la hipótesis nula indicamos que IMA (%) no tiene una distribución normal.

Anexo 6: Correlaciones

Correlaciones en parejas de Pearson Tienen normalidad

Muestra 1	Muestra 2	Muestra	Correlación	IC de 95% para ρ	Valor p
Alto PMM (%)		SYBR+	0.763	(0.539, 0.886)	0.000

Correlaciones en parejas de Spearman IMA. No tiene normalidad

1	Muestra 1	Muestra 2	Muestra	Correlación	IC de 95% para ρ	Valor p
	IMA (%)		SYBR+	0.647	(0.319, 0.837)	0.000
	IMA (%)		Alto PMM	0.600	(0.254, 0.811)	0.001

Anexo 7: ANOVA de un solo factor de la viabilidad espermática SYBR+ (%) vs. Raza

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raza	2	487.1	243.54	5.36	0.012
Error	24	1090.1	45.42		
Total	26	1577.2			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad. (ajustado)	(pred)
6.73959	30.88%	25.12% 12.52%

Medias

Raza	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Brown	9	20.49	9.57	(15.85,
Swiss				25.13)
Fleckvieh	9	20.52	4.05	(15.89,
				25.16)
Holstein	9	11.50	5.32	(6.86,
				16.13)

Desv.Est. agrupada = 6.73959

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Raza	N	Media	Agrupación
Fleckvieh	9	20.52	A
Brown Swiss	9	20.49	A
Holstein	9	11.50	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 8: ANOVA de un solo factor: Potencial de Membrana Alto PMM (%) vs. Raza

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Raza	2	684.3	342.14	5.86	0.008
Error	24	1400.8	58.37		
Total	26	2085.1			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7.63974	32.82%	27.22%	14.97%

Medias

Raza	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Brown Swiss	9	23.80	8.90	(18.54, 29.06)
Fleckvieh	9	28.19	5.28	(22.93, 33.44)
Holstein	9	16.01	8.25	(10.76, 21.27)

Desv.Est. agrupada = 7.63974

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Raza	N	Media	Agrupación
Fleckvieh	9	28.19	A
Brown Swiss	9	23.80	A
Holstein	9	16.01	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 9: ANOVA de un solo factor: SYBR+ (%) vs. Color

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Color	2	Amarillento, Blanquecino

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Color	1	7.23	7.225	0.12	0.737
Error	25	1569.99	62.800		
Total	26	1577.22			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7.92462	0.46%	0.00%	0.00%

Medias

Color	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Amarillento	14	18.00	9.82	(13.64, 22.36)
Blanquecino	13	16.97	5.13	(12.44, 21.49)

Desv.Est. agrupada = 7.92462

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Color	N	Media	Agrupación
Amarillento	14	18.00	A
Blanquecino	13	16.97	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 10. ANOVA de un solo factor: Alto PMM (%) vs. Color

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Color	2	Amarillento, Blanquecino

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Color	1	110.4	110.41	1.40	0.248
Error	25	1974.6	78.99		
Total	26	2085.1			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
8.88739	5.30%	1.51%	0.00%

Medias

Color	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Amarillento	14	24.62	10.39	(19.72, 29.51)
Blanquecino	13	20.57	6.90	(15.49, 25.65)

Desv.Est. agrupada = 8.88739

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Color	N	Media	Agrupación
Amarillento	14	24.62	A
Blanquecino	13	20.57	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 11. Prueba de Kruskal-Wallis: IMA (%) vs. Color

Estadísticas descriptivas

Color	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
Amarillento	14	22.1	17.1	2.09
Blanquecino	13	17.8	10.7	2.09
General	27		14.0	

Prueba

Hipótesis nula

H₀: Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna

H₁: Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	1	4.35	0.037
Ajustado para empates	1	4.36	0.037

Anexo 11. Fecha de nacimiento de los reproductores.

Nombre	Raza	Fecha Nacimiento
Galileo	Holstein	08/05/2011
Máximo	Holstein	28/11/2010
Noble Rey	Holstein	05/02/2010
Ángel	Brown Swiss	18/09/2008
Andrew	Brown Swiss	13/02/2007
Cónsul	Brown Swiss	11/03/2011
Máximus	Fleckvieh	27/11/2018
Álvaro	Fleckvieh	16/07/2019
Juda	Fleckvieh	11/07/2019