



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

TRABAJO DE TITULACIÓN

Previo a la Obtención del Título de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

MODALIDAD TRABAJO COMUNITARIO

TEMA:
“ASESORAMIENTO TÉCNICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN
DE UN SISTEMA DE EVALUACIÓN DE SEMEN POST
CONGELADO EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN”

AUTORES:
Egdo. Cedeño Espinales Alex Guillermo
Egdo. Seme Giler Jorge Andrés

TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN:
Dr. Rodolfo Pedroso Sosa, PhD

Santa Ana- Manabí- Ecuador
2021

TEMA.

“ASESORAMIENTO TÉCNICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE EVALUACIÓN DE SEMEN POST CONGELADO EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN”.

DEDICATORIA 1.

Después de tanto tiempo de dedicación, esfuerzo y estudio siempre tratando de demostrar lo mejor de mí para llegar a ser un **Médico Veterinario Zootecnista** quiero dedicar este trabajo de tesis a:

En primer lugar, a Dios quién supo guiarme por el camino del bien, darme fuerzas para no desfallecer ante los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni la esperanza de algo mejor.

Mi papá Jorge Arcadio Seme Mendoza que siempre me brindó su apoyo incondicional para que yo sea una mejor persona, mi mamá Narcisa de Jesús Giler Vera quien siempre estuvo pendiente de mi sin dejar que desfallezca de mis objetivos, a mis hermanas: Diana Jacqueline, Jennifer Joana, Ana Cristina, Silvina Karina, Andrea Estefanía y María Victoria quienes me demostraron su apoyo e incondicionalidad respaldándome siempre.

Y por último a profesores y amigos que me han apoyado, aquellos con los que hemos pasado historias imborrables e inolvidables.

Jorge Andrés Seme Giler.

DEDICATORIA 2.

Este trabajo de tesis, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que me acompañaron en el recorrido de mi carrera universitaria, aportando a mi formación tanto profesional y como ser humano.

En especial a mi padre Adalberto Floresmilo Cedeño Mendoza quien me enseñó a ser una persona respónsale y honesta, a mi madre María del Rosario Espinales Ríos quien siempre han sido mi gran apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida. A mis hermanas Erika Annabel y María Ximena por haber sido quienes siempre con sus consejos me apoyaron y creyeron en mí en todo momento.

Al Dr. Rodolfo Pedroso Sosa y al Dr. Juan José Zambrano Villacis quienes con su amplia experiencia y conocimientos me orientaron al correcto desarrollo y culminación con éxito de este trabajo para la obtención del título de **Médico Veterinario Zootecnista**, a través de ellos a la Universidad Técnica de Manabí: autoridades y docentes.

Mil veces gracias.

Alex Guillermo Cedeño Espinales.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos a Dios por habernos acompañado y guiarnos a lo largo de nuestra carrera, por ser nuestra fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarnos una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo Felicidad en esta hermosa Carrera como lo es la Medicina Veterinaria.

Le damos gracias a nuestros padres por apoyarnos en todo, por los valores que nos inculcaron y por habernos dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de nuestras vidas.

A nuestros hermanos por ser parte importante de nuestras vidas y representar la unidad familiar.

Les agradecemos la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a nuestros profesores por haber compartido con nosotros sus conocimientos y sobre todo vuestra amistad.

A nuestros amigos por confiar y creer en nosotros haciendo de nuestra etapa universitaria un trayecto de vivencias inolvidables.

LOS AUTORES

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.

CERTIFICACIÓN.

Yo, Dr. Rodolfo Pedroso Sosa PhD, tutor del presente trabajo de tesis certifico:

Que el proyecto de tesis titulada **“ASESORAMIENTO TÉCNICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE EVALUACIÓN DE SEMEN POST CONGELADO EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN”**

Realizado por los jóvenes egresados:

- Egdo. Cedeño Espinales Alex Guillermo
- Egdo. Seme Giler Jorge Andrés

Culmino bajo mi tutoría, revisando que se haya cumplido con todas las sugerencias y correcciones enunciadas y escritas mediante informe emitido por el revisor es así que considero que el trabajo de tesis se encuentra listo para ser presentado al H. Consejo Directivo.

Cumpliendo a cabalidad con los requisitos que para este efecto se requiere.

Dr. Rodolfo Pedroso Sosa, PhD.

TUTOR.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA

**“Asesoramiento técnico para la implementación de un sistema de
evaluación de semen post congelado en el laboratorio de
reproducción”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Sometida a consideración del Tribunal de defensa y legalizada por el
Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del Título
de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

APROBADA POR EL TRIBUNAL

.....
Dr. Edis Macías Rodríguez, PhD.
DECANO DE LA FACULTAD

.....
Dr. Rodolfo Pedroso Sosa, PhD.
TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

.....
Dr. Edis Macías Rodríguez, PhD.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

.....
Dr. Juan José Zambrano, Mg. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
Dr. Jimmy Álava Moreira Mg, Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN SOBRE LOS DERECHOS DE AUTOR.

Alex Guillermo Cedeño Espinales y Jorge Andrés Seme Giler, nos declaramos responsables de los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, denominado “Asesoramiento técnico para la implementación de un sistema de evaluación de semen post congelado en el laboratorio de reproducción” así como las ideas y conclusiones de la misma, son únicas y total de los autores.

Autores:

.....

Egdo. Alex Guillermo Cedeño Espinales

.....

Egdo. Jorge Andrés Seme Giler

ÍNDICE DE CONTENIDO.

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. LOCALIZACIÓN.....	5
III. FUNDAMENTACIÓN.....	6
3.1. Diagnóstico de la Comunidad.....	6
3.2. Identificación de Problema.....	6
3.3. Priorización del Problema.....	7
IV. JUSTIFICACIÓN.....	8
V. OBJETIVOS.....	9
5.1. Objetivo general.....	9
5.2. Objetivos específicos.....	9
VI. MARCO DE REFERENCIA.....	10
6.1. Inseminación artificial IA.....	10
6.2. Breve historia del origen la Inseminación Artificial (AI).....	10
6.3. Ventajas y Desventajas de la Inseminación Artificial.....	11
6.4. Recolección de Semen en Bovinos.....	12
6.4.1. Método de la Vagina Artificial.....	12
6.4.2. Método de Electroeyaculación.....	13
6.5. Pruebas de calidad del semen.....	14
6.5.1. Controles Macroscópicos.....	15
6.5.2. Controles microscópicos.....	15
6.5.3. Métodos computarizados de estudio del movimiento.....	15
6.6. Congelación del semen bovino.....	16
6.7. Procedimiento para la congelación del semen.....	19
6.8. Importancia de la congelación del semen.....	21
6.9. Procesamiento en Pajuelas.....	21
6.10. Evaluación del semen post -congelación.....	21
6.10.1. Prueba de la Viabilidad Espermática posterior a la descongelación.....	23
6.10.2. Prueba de permeabilidad de la membrana.....	24

6.10.2.1. Descripción de la técnica.	25
6.11. Número de espermatozoides con motilidad progresiva.....	27
6.12. Control sanitario del semen congelado.....	27
VII. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.	30
VIII. METODOLOGÍA.	31
8.1. MATRIZ DE INVOLUCRADOS	32
8.2. ÁRBOL DEL PROBLEMA.....	34
8.3. ARBOL DE OBJETIVOS.....	35
8.4. MARCO LÓGICO.....	36
IX. RECURSOS A UTILIZAR.....	38
9.1. RECURSOS HUMANOS.....	38
9.2. RECURSOS MATERIALES.	38
9.3. RECURSOS FINANCIEROS.....	38
X. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA.....	39
10.1. Compra de la máquina de congelación del semen.	39
10.2. Técnicas de evaluación del semen post congelación.....	40
10.3. Diseño del diagrama de flujo de la propuesta del sistema de evaluación de la calidad del semen congelado.....	40
XI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	42
11.1. CONCLUSIONES.....	42
11.2. RECOMENDACIONES.	43
XII. SUSTENTABILIDAD Y SOSTENIBILIDAD.....	44
12.1. SUSTENTABILIDAD.....	44
12.2. SOSTENIBILIDAD.....	44
XIII. PRESUPUESTO.	45
XIV. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.	46
XV. BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.	49

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Localización del área de trabajo.....	5
Figura 2.- Cambios morfológicos de los espermatozoides posteriores a los resultados del Test de Resistencia Hipo osmótica.	26
Figura 3.- Maquina congeladora de semen modelo TK 5000.	39
Figura 4.- Diagrama del trabajo de titulación.	41

ÍNDICE DE ANEXOS.

ANEXO 1.- Planificación del proyecto de titulación.....	51
ANEXO 2.- Planificación del proyecto de titulación.....	51
ANEXO 3.- Compa de la máquina congeladora de semen marca TK modelo 5000..	51
ANEXO 4.- Compa de la máquina congeladora de semen marca TK modelo 5000.	51
ANEXO 5.- Desembalaje y revisión de la máquina congeladora.....	52
ANEXO 6.- Desembalaje y revisión de la máquina congeladora.....	52
ANEXO 7.- Explicacion del funcionamieto de la máquina congeladora de semen.....	52
ANEXO 8.- Explicacion del funcionamieto de la máquina congeladora de semen.....	52
ANEXO 9.- Factura # 1 de la compra de la máquina.....	53
ANEXO 10.- Factura # 2 de la compra de la máquina.....	54
ANEXO 11.- Culminación de la obra de tesis.....	55
ANEXO 12.- Culminación de la obra de tesis.....	55
ANEXO 13.- Entrega de la obra con la presencia de las autoridades de la FCV.....	55
ANEXO 14.- Prueba de evaluación del semen post congelado.....	56
ANEXO 15.- Prueba de evaluación del semen post congelado.....	56
ANEXO16.- Análisis e interpretación de los resultados.....	56

RESUMEN.

El presente trabajo comunitario de titulación, se ejecutó en la facultad de ciencias Veterinarias, extensión Lodana, de la Universidad Técnica de Manabí. Teniendo como objetivo principal la implementación de un sistema de evaluación de semen post congelado, para lo cual se llevó a cabo la compra de una máquina modelo TK 5000, que no solo sirve para congelar pajuelas de semen sino también para transferencias de embriones y varias prácticas de campo que se hará con la participación de personal capacitado. El costo de este trabajo fue aproximadamente de \$8.000 contando con un equipo de primera calidad.

El proyecto duró cerca de 5 meses, y se hizo en primer lugar reconociendo el lugar donde se va a ubicar la máquina congeladora, con la finalidad de brindar un mejor trabajo al personal del laboratorio cuando sea utilizada.

La obra se entregó el viernes 26 de febrero del 2021, y será de gran aporte para los estudiantes ya que ellos son los principales beneficiarios, y a su vez los ayudaría en sus prácticas de campo. Se recomienda darle un mantenimiento apropiado a la máquina congeladora, debido a que con el uso prolongado se puede deteriorar.

Palabras clave: Implementación, Semen, Congelado, Pajuelas.

SUMMARY.

The present community degree work was carried out at the Faculty of Veterinary Sciences, Lodana extension, of the Technical University of Manabí. Having as main objective the implementation of a post-frozen semen evaluation system, for which the purchase of a model TK 5000 machine was carried out, which not only serves to freeze semen straws but also for embryo transfers and various practices. This will be done with the participation of trained personnel. The cost of this work was approximately \$ 8,000 with top quality equipment.

The project lasted about 5 months, and was carried out in the first place by recognizing the place where the freezing machine will be located, in order to provide a better job to the laboratory staff when it is used.

The work was delivered on Friday, February 26, 2021, and will be of great contribution to the students since they are the main beneficiaries, and in turn, it would help them in their field practices. Proper maintenance of the freezer is recommended, because with prolonged use it can deteriorate.

Keywords: Implementation, Semen, Frozen, Straws.

I. INTRODUCCIÓN.

La inseminación artificial es un proceso mediante el cual los espermatozoides obtenidos del macho son procesados, almacenados y artificialmente introducidos en el tracto reproductor de la hembra con el propósito de lograr una preñez. La técnica de inseminación artificial se ha convertido en uno de los procesos más importantes que se implementaron para el mejoramiento hereditario de los animales de granja logrando grandes objetivos y el progreso del ganado lechero que ha hecho que se obtengan animales de gran valor genético (Mejía, 2017).

El mejoramiento genético de los animales de granja se ha favorecido significativamente por el uso de la inseminación artificial, a su vez con el tiempo se ha logrado la mejora de la técnica de inseminación artificial lo que ha permitido en la actualidad implementar nuevas alternativas productivas, como transferencia de embriones y otras biotécnicas reproductivas (Castro, 2019).

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad, además de proporcionar una mejora económica para el productor, ya que reduce los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles (Ribeiro, 2014).

Una de las cuestiones importantes relacionadas con la eficiencia de las técnicas de criopreservación es la velocidad de reducción de la temperatura durante el congelamiento. El tipo de curva utilizada durante la congelación tiene influencia directa en el grado de las lesiones celulares, debido a procesos de deshidratación y formación de cristales de hielo intracelulares (Anchatuña, 2017).

En este contexto, con el fin de garantizar una adecuada calidad del producto resultante del proceso de crio conservación del semen en el laboratorio de biotecnologías reproductivas de la FCV mediante la recolección, evaluación, dilución y congelación del semen se han desarrollado múltiples procedimientos para evaluar las muestras seminales posterior a la crio conservación (Díaz, 2018).

II. LOCALIZACIÓN.

El presente trabajo se realizará en las instalaciones del laboratorio de biotecnología reproductiva de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la Universidad Técnica de Manabí, ubicada en la Parroquia Lodana, cantón Santa Ana, Provincia de Manabí, Ecuador.

CARACTERÍSTICAS CLIMATOLÓGICAS.

Pluviosidad media anual: 682,50 mm.

Heliofanía media anual: 1.354 horas luz.

Temperatura promedio anual: 25.39°C.

Evaporación media anual: 1.625,40 mm (Cedeño, 2019).



Figura 1.- Localización del área de trabajo.

III. FUNDAMENTACIÓN.

El asesoramiento técnico e implementación de un sistema de evaluación de semen post congelado en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, beneficiará y permitirá incrementar el desarrollo del proceso docente educativo y las prácticas docentes. Además, facilitará el desarrollo de proyectos de investigación de los estudiantes de titulación de pre y posgrado y los proyectos de vinculación destinado a la comunidad.

3.1. Diagnóstico de la Comunidad.

La Escuela de Medicina Veterinaria, es una unidad académica de prestigio en el campo de la investigación veterinaria, vinculada al desarrollo agropecuario; pero no cuenta con la infraestructura para un centro andrológico que permita buenas prácticas de laboratorio. Carece de unidades que permitan realizar estudios mediante la técnica de evaluación de semen post congelado en laboratorio de reproducción. Es por esto, que se propone ejecutar el asesoramiento técnico para la adecuación de esta área, permitiendo de esta manera vincular la producción con la sociedad y mejorar la calidad de aprendizaje de los estudiantes de esta Facultad.

3.2. Identificación de Problema

La Facultad de Ciencias Veterinaria en la actualidad no cuenta con equipos tecnificados en el laboratorio de biotecnología reproductiva para evaluar muestras de semen. En este sentido, esta facultad dentro de sus prioridades sustenta la necesidad de crear una base material sólida y actualizada tanto en infraestructura como equipamiento de los laboratorios de biotecnología reproductiva con énfasis en el área de Andrología con el fin de que las nuevas generaciones de profesionales adquieran el conocimiento de esta especialidad con un alto nivel académico.

Una de las premisas fundamentales de los laboratorios de biotecnología reproductiva y específicamente el área de dilución y crio conservación del semen, es la necesidad de garantizar la calidad de estas actividades técnicas que aseguren dosis seminales de alta calidad para la posterior implementación de un sistema de evaluación de semen post congelado en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Este instrumento tecnológico beneficiará y permitirá incrementar el desarrollo docente educativo y científico, que concederá a las próximas generaciones la realización de prácticas para los estudiantes de esta Facultad, haciéndolos capaces de desarrollar destrezas acerca del manejo en esta especie, pero con la adecuación completa del área.

3.3. Priorización del Problema.

La principal prioridad de las instalaciones del Área de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias es contar con equipos tecnificados y las instalaciones adecuadas que faciliten el desempeño diario tanto de los operarios como de las especies involucradas en esta área.

Este lugar también se aprovecharía para realizar prácticas estudiantiles y pasantías pre-profesionales donde los estudiantes podrán ejecutar lo aprendido en el aula de clases, buscando elevar el nivel académico de los futuros profesionales de nuestra alma mater.

IV. JUSTIFICACIÓN.

Existe la necesidad de contar con un laboratorio equipado en el área de producción de la Facultad de Ciencias Veterinarias, para la evaluación de semen post-congelado. Esto es de suma importancia para que los investigadores realicen sus análisis y contribuyan con un servicio científico y técnico de excelencia a la medicina veterinaria, tanto en salud y el bienestar económico del hombre.

Con esto se busca identificar la calidad sanitaria espermática para prevenir y controlar enfermedades venéreas, así también para garantizar la sanidad animal ya que estos juegan un rol importante en la producción y reproducción ganadera, a través de las experiencias aplicadas en dicho lugar difundirlo en la población, razón por la que se justifica la gestión de este trabajo comunitario.

V. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

- Asesorar la implementación de un sistema de evaluación de semen post congelado en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva en la Facultad de Ciencias Veterinarias.

5.2. Objetivos específicos.

- Adquirir los equipos para evaluar el semen post congelado en el laboratorio.
- Conocer los procedimientos para la evaluación de semen post congelado e implementar un diagrama de flujo que permita valorar las dosis de semen posterior al proceso de congelación.

VI. MARCO DE REFERENCIA.

6.1. Inseminación artificial IA.

Durante muchos años, la ganadería vacuna ha sido receptora de diferentes tecnologías, en su mayoría provenientes de países industrializados que se han incorporado a los esquemas de trabajo de las fincas ganaderas, con la finalidad de mejorar e incrementar la productividad de estos sistemas. Una de esas tecnologías ha sido la inseminación artificial (IA), la cual es una práctica utilizada para el manejo reproductivo y genético (Velasco, 2008).

La IA es la técnica que consiste en lograr la fertilización del óvulo utilizando medios mecánicos, procedimiento que consiste en depositar los espermatozoides obtenidos del macho en el aparato genital de la hembra, lugar donde se unirán con el óvulo y darán inicio al desarrollo del nuevo ser. Esta técnica es considerada la primera biotecnología aplicada para mejorar la reproducción y la genética de los animales de granja y ha demostrado su gran eficiencia para el mejoramiento genético, contribuyendo en la mejora de los indicadores productivos (Cabodevil, 2015).

6.2. Breve historia del origen la Inseminación Artificial (AI).

La Inseminación Artificial (IA) es una rama de la biotecnología aplicada a la reproducción, en la que se sustituye la monta o servicio natural por un sistema instrumental, en el cual el hombre interviene en cada uno de sus pasos (Díaz, 2018).

Respecto al origen de la IA, existen historias no bien documentadas, señalan a los árabes como los primeros en haber realizado la recolección de semen de machos equinos y realizar la inseminación artificial en yeguas propias (Hernandez, 2015). Pero, Kumar, (2015) menciona que su uso fue aproximadamente el año 1300. Sin embargo, aunque en Europa, se encuentra el primer reporte escrito, el cual cita que la primera IA la hizo en 1780 el fisiólogo italiano Lázaro Spallanzani en una perra, la cual parió tres cachorros 62 días después. En la actualidad se considera como pionero en el

establecimiento de los procedimientos prácticos de la inseminación artificial al profesor ruso Ivano que había reportado en el Journal of Agricultural Science haber inseminado perros, lobos, caballos, ovinos y aves, con el consiguiente desarrollo (Hernandez, 2015).

Pasaron muchas décadas en la que fueron desarrollados diferentes procedimientos para la recolección, evaluación de la calidad del semen, así como procedimientos de diluyo conservación hasta los días de hoy en que la IA es una técnica sencilla y práctica, capaz de realizarlo en cualquier hato ganadero que se requiera. El uso de esta tecnología ha permitido hasta un 50% del aumento en la producción ganadera en países como Canadá y el Reino Unido hecho que ha sido atribuible al mejoramiento genético logrado través del uso de la IA; y el resto es debido al mejoramiento de factores ambientales como: la salud, el sitio de pastoreo, la nutrición y la administración. Lo que da una idea del potencial que tiene la IA para fomentar el desarrollo productivo de la ganadería, siempre y cuando se establezcan esfuerzos a una escala significativa, en lo posible del ámbito público y privado (Quintero, 2016).

6.3. Ventajas y Desventajas de la Inseminación Artificial.

Aunque la inseminación artificial es una de las herramientas más importantes para el mejoramiento genético de los animales se han planteado las principales ventajas e inconvenientes de esta tecnología las cuales se resumen a continuación:

- a) Ventajas: mejora genética, eliminación del toro, control sanitario, conocimiento del rodeo, disminución de costos
- b) Desventajas: disminución de la fertilidad en comparación con la monta natural, se requiere personal capacitado y dificultad en la detección de celos.

También pueden transmitirse enfermedades con la inseminación, especialmente aquellas cuyo agente etiológico no se destruye por los

antibióticos, por ejemplo, *Mycobacterium bovis*, el cual resiste también el congelado, pudiendo causar lesiones genitales en la hembra que se inseminó. Técnicos o propietarios no controlados e inescrupulosos podrían sustituir espermatozoides buenos por el de animales poco valiosos (Hernandez, 2015).

Otros motivos de fracaso de la inseminación serían:

- Falta de supervisión veterinaria.
- Motivos debidos al semen.
- Motivos debidos al inseminador.
- Motivos inherentes al animal.
- Motivos del establecimiento (Cabodevil, 2015).

6.4. Recolección de Semen en Bovinos.

En los bovinos los métodos más empleados para recoger semen son:

- Método de la vagina artificial.
- Masaje por vía rectal de las vesículas seminales y de las ampollas deferentes.
- Electroeyaculación.
- Recuperación de la vagina luego de la monta
- Preservativo o condón (Anchatuña, 2017).

De entre los cuales el método de la vagina artificial y la electroeyaculación son los más utilizados en nuestro medio.

6.4.1. Método de la Vagina Artificial.

Según Moncayo, (2016) la primera vagina artificial para bovinos se construyó en Rusia y se adoptó en la práctica en 1932. Luego este instrumento se comenzó utilizar en todos los países, donde también cada experimentador y muchos técnicos introdujeron diversas modificaciones interesantes. Existen varios modelos de vagina donde solo existen pequeñas diferencias una con otra.

Este método consta de un tubo cilíndrico externo de tela de goma rígida, de 60 cm de largo en el modelo grande, y 40 - 50 cm en el pequeño. El espesor

del tubo es de 0.5 - 0.7 cm y el diámetro de 6 cm. Del lado interno del tubo rígido, en correspondencia con el extremo llamado peneano donde el toro introduce el pene, se fija un disco de espuma de goma de 1.5 cm de espesor y fijado solo en el medio, de modo que las partes se unan al desarmar el instrumento (Rivera, 2016).

En correspondencia con el extremo opuesto, se aplica un anillo de espuma de goma de 1.5 cm de espesor. El disco y el anillo cumplen una misma función:

Impedir que el agua del intersticio desborde los extremos del cilindro hueco y se acumule en uno de ellos o en ambos, lo que representa un serio inconveniente y, entre otras cosas, puede determinar la ruptura de la camisa interna (Cabodevil, 2015)

Para Kumar, (2015) la presión y temperatura adecuada de la vagina artificial se obtiene llenando con agua de la mitad a dos terceras partes del espacio existente entre la camisa, según el tamaño del pene del toro. Durante la recolección, la temperatura interna de la vagina artificial debe estar entre 40 - 52 oC.

La recolección con la vagina artificial sostenida a mano no exige ningún esfuerzo especial por parte del operador quien, una vez penetrado el pene, se limitará a dejar el prepucio y a seguir, con el instrumento, el enérgico movimiento hacia delante y arriba que el toro cumple a su vez, con el impulso violento hacia arriba y delante de la pelvis (Curbelo, 2013).

6.4.2. Método de Electroeyaculación.

Aparentemente las primeras técnicas de electroeyaculación fueron realizadas por Battelli en 1922 quien introdujo electrodos en la base del cerebro en un cerdo de Guinea macho. Por su parte, en ovinos éstas fueron efectuadas por Gunn en Australia en 1935 y Olbrycht en Polonia en 1937 (Cabodevil, 2015).

Para Cedeño, (2019) las innovaciones redujeron notablemente el tiempo de recolección, así como los voltajes necesarios para lograr el mismo. Por otro lado, Gomez (2015), entre otros, afirman que en el 90% - 95% de los casos de electroeyaculación hubo erección y protrusión del pene y los animales se

mantuvieron tranquilos, con estrés físico escaso o negativo. Según Bonadonna, el método de la electroeyaculación se considera conveniente cuando no es posible usar la vagina artificial, sobre todo cuando el toro no pueda efectuar la monta, cualquier sea la razón.

Según Díaz, (2018) practicó inseminación artificial con semen de toro obtenido mediante electroeyaculación o con vagina artificial considera que la diferencia de 4% observada a favor del material obtenido por electroeyaculación no es significativa pero interesante, ya que demuestra que ese material seminal no tiene efecto deletéreo en la fertilidad.

6.5. Pruebas de calidad del semen.

Para Hernández, (2015) los exámenes de calidad del semen solo pueden ser realizados satisfactoriamente en un tiempo aproximado dentro de un breve período posterior a la recolección.

Los eyaculados deben ser adecuadamente protegidos y manejados hasta examinarlos. La evaluación del semen en el laboratorio no es una prueba de fertilidad. Algunos factores a tener en cuenta para el adecuado manejo del semen son:

- La vagina artificial, o el recipiente empleado para recoger el semen en la electroeyaculación, debe estar limpio y libre de contaminantes que pueden dañar a los espermatozoides, como el alcohol, excesiva vaselina, polvo presente en las camisas nuevas de goma, y antisépticos o sustancias químicas de cualquier clase (Cedeño, 2019).
- En el momento de la recolección, hay que evitar que la vagina se contamine con excesiva suciedad o desechos, incluido esmegma prepucial y secreciones; el agua y la orina dañan a los espermatozoides creando una presión osmótica diferente (Rivera, 2016).
- Las cantidades excesivas de sangre y suero pueden perjudicar a los espermatozoides.
- El sobrecalentamiento y el enfriamiento demasiado rápido dañan a los espermatozoides.

- La excesiva agitación y sacudimiento del semen afecta a los espermatozoides.
- Debe evitarse la exposición excesiva al sol (Curbelo, 2013).

6.5.1. Controles Macroscópicos.

- Volumen o Cantidad de Eyaculado.
- Aspecto General y Movimiento de Masa.
- Olor.
- Color.
- Acidez (pH) (Ribeiro, 2014).

6.5.2. Controles microscópicos.

- Actividad cinética.
- Densidad.
- Motilidad individual (Castro, 2019).

Escala de valores:

- 5/5 80 a 100 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.
- 4/5 60 a 80 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.
- 3/5 40 a 60 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.
- 2/5 20 a 40 % de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.
- 1/5 20 o menos de espermatozoides con movimiento rectilíneo uniforme.

Valores aceptados como normales: 5/5 y 4/5 (Gomez, 2015).

6.5.3. Métodos computarizados de estudio del movimiento.

- Determinación de células vivas y muertas.
- Determinación de anomalías espermáticas.
- Concentración espermática.
- Examen Viroológico y Bacteriológico del Material Seminal (Díaz, 2018).

6.6. Congelación del semen bovino.

Uno de los descubrimientos en el campo de la inseminación más importante del siglo pasado fue el desarrollo práctico de los métodos para la preservación del semen durante un largo tiempo, por medio de la congelación con hielo seco a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en nitrógeno líquido con aceptable fertilidad (Valverde, 2018).

En este sentido, corresponde a la Waterloo Cattle Breeding Association de Waterloo, Canadá, ser la primera organización en el mundo que utilizó 100% semen congelado en los inicios de 1954 (Mejía, 2017). Estos resultados tienen en la actualidad un importante papel en la implementación de los programas de mejoramiento genético y conservación de la biodiversidad del ganado vacuno. De acuerdo con los resultados experimentales, se ha enfatizado, que la reducción de la temperatura por debajo de los $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, principalmente de 20°C , induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Quintero, 2016).

El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del N_2 líquido, sino mantener la integridad en un rango de temperatura, entre -15°C y -60°C , en el que se producen los mayores daños, y que las células experimentan en dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que por debajo de -130°C no existe agua en estado líquido (Cedeño, 2019).

Aunque las técnicas para la crio-conservación de espermatozoides inicialmente han tenido un progreso lento, los efectos de la crio-conservación sobre la función espermática y la fertilidad han sido ampliamente estudiados y descritos, particularmente en bovinos. En los últimos protocolos para la congelación del semen en esta especie con adecuada fertilidad. Sin embargo, existen algunos factores que provocan ciertos cambios morfológicos y funcionales en la célula espermática durante este proceso tecnológico tales como:

A). Shock Térmico: El shock térmico en bovinos es el conjunto de alteraciones que los espermatozoides sufren cuando son sometidos a un enfriamiento rápido pasando de 20°C a 5°C. Estas alteraciones están representadas por la disminución de la actividad metabólica de los espermatozoides y la pérdida rápida de motilidad; la alteración del tipo de motilidad con un movimiento retrogrado y circular, reducción del metabolismo, lesión del acrosoma y de la membrana plasmática acompañada de pérdida de los componentes intracelulares (Anchatuña, 2017). De acuerdo diversos estudios, se comprobó, que cuando los espermatozoides están alterados los iones Na^+ y Ca^{++} entran en las células espermáticas y son retirados por medio de transporte activo. A 5°C la permeabilidad del Ca^{++} crece significativamente superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca^{++} de esta forma, el Ca^{++} se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos (Carpio, 2015)

B). Estrés Osmótico y Formación de Cristales de Hielo: Otras alteraciones o fenómenos que ocurren en el proceso son el choque térmico y la formación de grandes cristales de hielo intracelular. Estos procesos ocurren si la curva de congelación es muy rápida, lo que genera la deshidratación progresiva de la célula. Al respecto, Veloz, (2017) señaló, que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la crio preservación en función de si se trata de si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta

C). El estrés oxidativo: Este fenómeno es inducido por la formación de cristales de hielo y está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada. Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación. Los cristales de hielo se enuclean y el agua pura se cristaliza formando hielo, los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y la presión osmótica de la solución restante dependen de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada (Ribeiro, 2014). Según Curbelo (2013), la tasa de congelación está directamente relacionada con la permeabilidad de

la membrana celular. Por lo tanto, las tasas de congelación demasiado rápidas causan daños estructurales por la formación de hielo intracelular y las tasas de congelación demasiado lentas causaran daño a las proteínas debido a las sales; el daño de la mayoría de las células se produce durante la congelación y el deshielo, por esta razón la descongelación del semen en general debe hacerse muy rápido para disminuir la posibilidad de daños por el crecimiento extracelular de cristales de hielo.

El estrés oxidativo en los espermatozoides consiste en el daño de los componentes estructurales y fisiológicos que surgen en ellos cuyo efecto está directamente relacionado con la disminución de la sobrevivencia y capacidad fecundante (Velasco, 2008). El estrés oxidativo es provocado por la formación de gran cantidad de especies reactivas al oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres, las cuales se hacen presentes durante el manejo y manipulación del eyaculado, comprometiendo la viabilidad de los espermatozoides (Cedeño, 2019).

Las membranas de los espermatozoides contienen alto porcentaje de ácidos grasos polinsaturados y baja concentración de enzimas protectoras de las formas tóxicas del O₂ (catalasas, dismutasas, peroxidasas y glutatión reductasas) esta relación entre ácidos grasos insaturados y enzimas protectoras convierte a los espermatozoides en células muy sensibles a las peroxidaciones por ROS (Gomez, 2015). Los principales ROS que se conocen y que tienen relación con la funcionalidad espermática son: anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, precursor de radical) y la mayoría de radicales hidroxilos (-OH); cuya presencia en el ambiente espermático se relaciona con el aumento de espermatozoides muertos (Valverde, 2018).

De acuerdo con Ribeiro (2014), la susceptibilidad al estrés oxidativo varía entre las especies, los individuos y eyaculados por lo tanto la incidencia y severidad del daño oxidativo también varían. Cuando el semen se manipula para su uso en inseminación artificial se expone al oxígeno y varios pasos de su procesamiento pueden conducir a la producción de ROS y la reducción de las defensas antioxidantes. El lavado y dilución por ejemplo puede retirar o

reducir la protección antioxidante proporcionada por el plasma seminal. Todos estos factores pueden contribuir a aumentar el daño oxidativo de los espermatozoides en el semen manipulado.

6.7. Procedimiento para la congelación del semen.

Según Rivera, (2016) El proceso de congelación de semen bovino incluye los siguientes pasos: colecta, evaluación del semen, cálculo del número de pajillas posibles, dilución del semen al volumen requerido y finalmente el proceso de criopreservación. El proceso de colecta debe ser higiénico y evitando el shock térmico de los espermatozoides. Los toros *Bos taurus* (“mansos”) se pueden colectar con vagina artificial con la ayuda de una vaca en celo (aunque puede no estar en celo e inclusive puede ser un buey), mientras que los toros *indicus*, de ganadería de carne (que se consideren peligrosos) deben ser colectados por medio de la EE para proteger a los operarios. El EE consiste en un transductor con tres electrodos ubicados centralmente y que se coloca por vía rectal una vez se evalúan las heces. El operario colecta el semen en una bolsa e inmediatamente el semen debe ser evaluado (Cedeño, 2019).

La evaluación del semen incluye la determinación del volumen, color, la motilidad (masal e individual progresiva) y la morfología. Con esta información se calcula el número de espermatozoides viables en la muestra. Después se divide este número por el número deseado por pajilla (generalmente de 20 millones) y se calculan el total de pajillas posibles con el semen obtenido. También se calcula el volumen de diluyente que se requiere para ese número de pajillas (Velasco, 2008).

De acuerdo con lo establecido por Castro (2019), El diluyente que se añade para congelación generalmente es del tipo TRIS (buffer), El diluyente debe contener sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolaridad del medio (TRIS), una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (yema de huevo, leche descremada), una fuente de energía como fructosa o glucosa, y un crioprotector. Existen varios tipos de crioprotectores: Los que penetran la

membrana como son el 1,2-Propanodiol (PROH), el Dimetilsulfóxido (DMSO), el Etilén-Glicol (EG) y el Glicerol; los que no penetran la membrana como, Sacarosa, Glucosa, Dextrosa, Polivinil-pirrolidona (PVP), Dextran, Polietilenglicol (PEG). De estos el más utilizado para la criopreservación de semen bovino es el glicerol a una concentración final en el diluyente del 7%.

El diluyente puede venir en dos fracciones o en una fracción. Si viene en una fracción (glicerol 7%) simplemente se añade el diluyente al semen (lo más rápido posible después de la colecta). Si son dos fracciones, lo que implica es que una fracción es simplemente buffer (Fracción A) y la otra contiene el crioprotector que generalmente es glicerol al 14% (fracción B). Cuando son dos fracciones la mitad del diluyente es A (ej 64 ml) y la otra mitad es B (ej 64 ml). La primera fracción se añade a temperatura ambiente y la segunda fracción se añade a 4-5°C Independiente de si es una fracción o dos el semen, una vez diluido debe empezar una curva de frío lenta para que éste llegue a 5°C en un lapso de 2 horas (Kumar, 2015). Después de diluido completamente el semen viene el siguiente paso que es el periodo de equilibrio que puede durar de 2- 4 horas y se realiza a 5°C. En este tiempo el crioprotector penetra las membranas del espermatozoide para protegerlo de los daños que se pueden generar durante la criopreservación y la descongelación (Hernandez, 2015).

Después de alcanzado el equilibrio, se congela el semen a vapores de nitrógeno líquido (-120°C) por un lapso de 10 minutos y luego se sumergen las pajillas en el nitrógeno para ser almacenadas. Muy importante el proceso de evaluación del semen postdescongelación. Se considera que el semen apto para usar en inseminación artificial convencional, debe tener al menos 10 millones de espermatozoides viables a la descongelación, y este semen debe tener una motilidad progresiva mínima del 30-35%. También se le debe realizar una prueba de resistencia que consiste en evaluar la motilidad del semen por dos horas. El semen debe tener al menos 5% de motilidad a las dos horas de descongelado. También se debe tomar una pajilla y enviarse para cultivo microbiológico. Después de aprobado, las pajillas se empaquetan en

escalerillas que pueden contener entre 10-20 pajillas. Aunque también hay goblets que permiten el empaque a granel (Carpio, 2015).

6.8. Importancia de la congelación del semen.

De acuerdo con lo establecido por Valverde (2018), la criopreservación de semen puede tener dos propósitos: para uso interno o para comercialización. Si es para uso interno el procedimiento puede ser efectuado a nivel de finca, pero si es para uso comercial, este proceso debe ser realizado en centros de colecta y congelación de semen debidamente acreditados por AGROCALIDAD. En cuanto a la utilización de semen sexado, a pesar de que se ha avanzado mucho en el proceso, todavía las tasas de preñez son bajas en vacas y por consiguiente su uso se restringe principalmente a novillas fértiles.

6.9. Procesamiento en Pajuelas.

- Cálculo de Dilución.
- Enfriado.
- Glicerolización: (adición de glicerol).
- Equilibración.
- Envasado.
- Congelación.
- Descongelado (Díaz, 2018).

6.10. Evaluación del semen post -congelación.

La premisa a tener en cuenta cuando se evalúa semen es que no existe ningún examen in vitro que esté altamente correlacionado con la fertilidad. Pero existen diversas pruebas de laboratorio para “estimar” la calidad del semen que son extremadamente útiles si son realizadas correctamente e interpretadas con criterio.

El semen congelado no es un producto uniforme, esto se debe a dos razones fundamentales: - Existe un rango de cierta amplitud entre los valores mínimos

requeridos para liberar una partida de semen congelado al mercado y un semen de alta calidad por las sugerencias de la propia industria como una forma de garantizar calidad, en los últimos años, se establecieron normas ISO 9002 de calidad para los Centros de Inseminación Artificial, contemplando exigencias mínimas respecto a los parámetros antes señalados. Sin embargo, aunque se parta de un semen de alta calidad, la calidad seminal puede verse afectada durante la distribución y el almacenamiento, si en estas etapas no se realiza un cuidadoso manejo del producto (Díaz, 2018).

Esta observación no se debe pasar por alto porque muchas veces la evaluación de dosis de semen congelado arroja resultados que desaconsejan su utilización y los mismos se atribuyen erróneamente al proceso de elaboración (Cedeño, 2019). Para evaluar semen resulta esencial contar con un microscopio de calidad, preferentemente con adaptación para contraste de fase, una platina térmica y un baño María y se deben tener en cuenta al menos 3 parámetros básicos. Ellos son: - Viabilidad post-descongelación. - Morfología. - Prueba de permeabilidad de la membrana espermática -Número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis del semen a utilizar en el servicio- Control sanitario de los sementales, semen almacenado y distribuido (Valverde, 2018).

Existen múltiples factores que pueden afectar la calidad del semen posterior al proceso de congelación, algunos relacionados con los protocolos de crio conservación que se utilicen, la competencia de los eyaculados y células espermáticas para resistir esta acción de congelación y descongelación y los accidentes que pueden ocurrir durante el almacenamiento o distribución (Veloz, 2017). Por consiguiente, con el objetivo de garantizar una adecuada calidad y eficiencia de los servicios de inseminación con semen congelado, se utilizan varias pruebas que permiten evaluar la calidad de las dosis de semen previo a su uso en el campo.

6.10.1. Prueba de la Viabilidad Espermática posterior a la descongelación.

Se determina mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático. Para el desarrollo de esta prueba el semen debe ser incubado a 37° C durante 2 horas. Esta evaluación es conocida como prueba de Termoresistencia o de incubación. Esta prueba puede ser realizada de distintas formas. Para su ejecución, se descongelamos 2 pajuelas de la misma partida simultáneamente. A la hora 0, vaciamos el contenido de una de ellas en un tubo de vidrio que contiene un volumen de solución fisiológica equivalente al de la pajuela, procediendo de inmediato a evaluar la motilidad progresiva y el vigor espermático. La otra pajuela permanece en el baño María y es diluida en el momento de efectuar las determinaciones correspondientes a la segunda hora de incubación (Hernandez, 2015).

6.10.1.1. Procedimiento.

El contenido de las pajuelas se diluye en 1 ml de solución fisiológica y el semen se mantiene tapado dentro del baño en un tubo de vidrio neutro. a) Examen de motilidad: el porcentaje de motilidad progresiva y el vigor son determinados inmediatamente después de descongelado el semen y luego de dos horas de incubación. Diversos métodos pueden ser utilizados para determinar motilidad. Cuando se cuenta con experiencia, generalmente se realizan estimaciones visuales rápidas (subjetivas) o el uso de sistemas computarizados (CASA). Para realizar esta operación, se toma una gota de semen delgada y uniforme es colocada entre porta y cubre objetos tibios procediendo a evaluar a 100 aumentos el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y luego, la tasa de progresión (vigor). Esta, última puede ser cuantificado utilizando la siguiente escala:

0= sin movimiento.

1= ligera ondulación o vibración de cola, sin progresión.

2= progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento.

3= movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.

4= movimiento progresivo, rápido.

5= movimiento progresivo muy rápido, en el cual las células son difíciles de seguir visualmente.

El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40-50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3-4. Después de dos horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10- 15% y 1 punto (vigor), respectivamente. Las normas mínimas para motilidad exigidas se corresponden con las de las normas ISO 9002. Ellas son: 0 hs= 25% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 3. 2 hs= 15% de espermatozoides con motilidad progresiva. Vigor 2 (Curbelo, 2013).

En los últimos años han sido introducidos análisis por sistemas de computación (Sistema Casa), los cuales proporcionan un método objetivo de determinación de la motilidad espermática. Una cámara de circuito cerrado de televisión, montada sobre un microscopio alimenta información a un sistema de computación, el cual entrega inmediatamente caracteriza las subpoblaciones de espermatozoides y entrega la información del porcentaje de motilidad progresiva, el vigor, la concentración espermática y el número de espermatozoides móviles por mililitro (Saavedra, 2018).

6.10.2. Prueba de permeabilidad de la membrana.

Uno de las características de los espermatozoides que debe ser evaluada antes o (semen fresco) posterior al proceso de congelación son los daños que se producen en la capacidad de permeabilidad de la membrana. Por consiguiente, se han desarrollado varias pruebas con el fin de localizar tales cambios morfológicos que afectan la calidad del semen. En esta dirección,

corresponde a Jeyendran *et al.*, (1984), haber desarrollado una prueba con estos fines diagnóstico de la calidad del semen (Gomez, 2015).

La integridad de la membrana plasmática y acrosomal, ha sido utilizada para valorar la calidad seminal, por ser responsables de hacer efectivas las interacciones entre células, tanto desde el punto de vista morfológico como funcional. El test de resistencia osmótica evalúa la sensibilidad de estas membranas a cambios súbitos en la osmolaridad del medio y por tanto su salud, pudiendo predecir la capacidad fecundante de una muestra seminal dada (Hernandez, 2015).

Esta prueba tiene dos orientaciones una encaminada a dilucidar los cambios que ocurren a nivel de la membrana acrosómica (Prueba ORT) y otra en la parte motriz del nemaspermio es decir a nivel de la cola. (Prueba (HOST). En rumiantes, se ha sugerido el uso de fructosa o citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/L o un poco más elevadas (150 mOsm/L) para evitar la aparición de falsos negativos, producto de la ruptura de la membrana plasmática que fisiológicamente debería estar en condiciones isosmóticas a 300-320 mOsm/L (Díaz, 2018).

Esta prueba se fundamenta en la suspensión de espermatozoides en un medio hipo osmótico que ocasiona un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que la célula compensa fisiológicamente difundiendo agua al compartimento intracelular y como consecuencia, el espermatozoide aumenta su volumen con consecuentes cambios morfológicos en los flagelos, como dilatación y enrollamiento de los mismos. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y funcional (Curbelo, 2013).

6.10.2.1. Descripción de la técnica.

Para (Cabodevil, 2015) la valoración de la funcionalidad e integridad de la membrana cromosomal tanto para el semen fresco, como para el descongelado. Se incubando el semen durante 30 minutos en un medio hipo osmótico de citrato de sodio a 150 mOsm/kg en un baño maría termoestable a 37°C, luego

se centrifugaban a 2000 rpm por 2,5 minutos en una micro-centrífuga (Minispin plus eppendorf 22331 Hamburg). Se tomaban 10 μ L del centrifugado y se mezclaban suavemente con 10 μ L del colorante eosina-nigrosina. En el microscopio óptico, utilizando el objetivo de inmersión (100X), se contaban 200 espermatozoides y se observaban las reacciones acrosómicas (acrosomías parciales y pérdidas totales del acrosoma y el doblaje de la cola y el resultado final en porcentaje (Castro, 2019).

En la Figura # 2, se aprecia los cambios morfológicos observados durante el desarrollo de la prueba. Las imágenes ay b son negativas a la prueba lo que sugiere que en estos nemaspermios existen daños de la permeabilidad de la membrana. Mientras, las imágenes c, d, e, f y g muestra resultados positivos lo cual indica que no hay daños ostensibles en la permeabilidad de la membrana de los espermatozoides (Valverde, 2018).

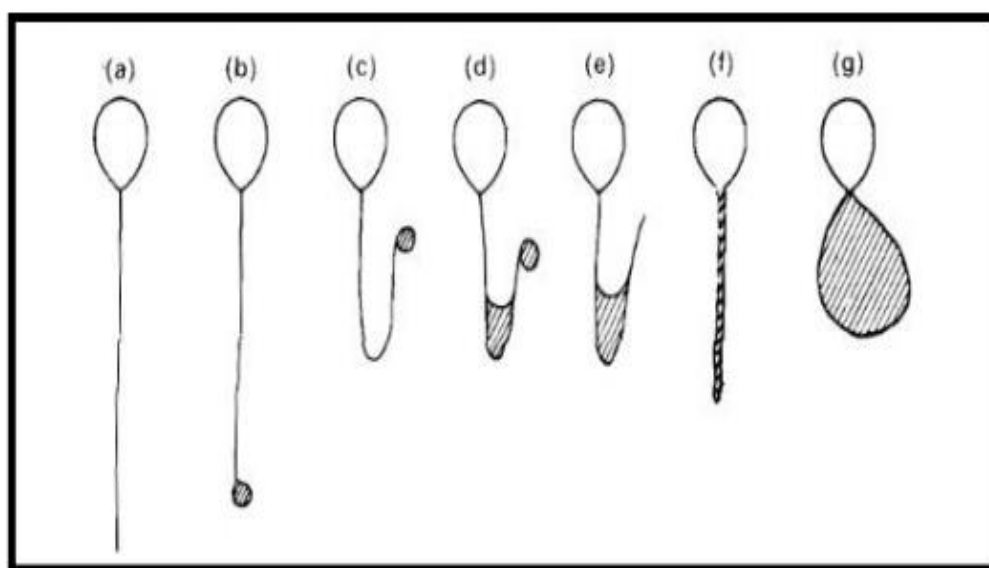


Figura 2.- Cambios morfológicos de los espermatozoides posteriores a los resultados del Test de Resistencia Hipo osmótica.

Los resultados de ambas pruebas se consideran óptimos cuando se obtienen valores superiores a 80 % antes de los procesos de congelación y 50 % posterior al proceso de congelación. En estos casos se ha encontrado una

alta correlación con la motilidad, competencia del eyaculado para la crío conservación y capacidad fecundante del semen (Saavedra, 2018).

6.11. Número de espermatozoides con motilidad progresiva.

Esta evaluación surge de multiplicar el número de espermatozoides totales por el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a la hora cero posterior a la descongelación. Existen al menos 4 formas distintas de determinar el número de espermatozoides, el método hemocito métrico vigente que establece, que la dosis usada en cada servicio de IA no debía ser inferior a 10 millones de espermatozoides con motilidad progresiva cuando se usa semen congelado en pastillas. Pero en eyaculados congelados en pajuelas y de acuerdo con las normas ISO 9002 establecen que la dosis inseminante debe tener un mínimo de 8 millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Este número puede reducirse a 6 millones si el semen posee más de 30% de espermatozoides con motilidad progresiva y si la tasa de anomalías es inferior al 25% o si, el porcentaje de no retorno 60/90 de 300 primeros servicios de inseminaciones resulta equivalente al obtenido con 8 millones (Castro, 2019).

6.12. Control sanitario del semen congelado.

La IA tiene como objetivos mejorar la calidad genética y también prevenir o eliminar enfermedades venéreas. Sin embargo, la técnica no está exenta de riesgos, pues puede convertirse en vía de diseminación o en fuente de propagación de enfermedades infecciosas a nivel nacional e internacional. El semen crío preservado es un excelente mecanismo de control sanitario si se tienen en cuenta las siguientes premisas:

- a) Es necesario determinar el estado sanitario de los sementales utilizados como dadores dado que el semen puede vehiculizar bacterias, virus, hongos patógenos u oportunistas. - La mayoría de estos microorganismos sobreviven al proceso de congelación y a los antibióticos que se añaden al diluyente (Hernandez, 2015).

- b) Es obligatorio controlar el eyaculado previo y a posterior de la congelación, para determinar la presencia de gérmenes dado que, de un eyaculado se obtienen muchas dosis de semen, por lo tanto, el riesgo de diseminación de enfermedades en diferentes fincas y/o rebaños es elevado. Esto es más grave aún si se considera que, en IA el semen es depositado en útero, por lo tanto, no es expuesto a los efectos bactericidas de las secreciones del cuello uterino y de la vagina durante el estro (Curbelo, 2013).

Generalmente este control sanitario se realiza siguiendo el siguiente protocolo:

- a) Cuarentena obligatoria de todos los toros que ingresen al centro de IA y/o finca por 60 días realizándose las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas antes y posterior al período de cuarentena (Díaz, 2018).
- b) Realizar cada seis meses los siguientes diagnósticos en la finca y/o centro de IA a todos los toros.
- c) Brucelosis.
- d) Leptospirosis.
- e) Tuberculosis.
- f) Paratuberculosis.
- g) IBR.
- h) Lengua Azul.
- i) Campilobacteriosis.
- j) Trichomoniasis.
- k) Diarrea viral Bovina.

l) Leucemia Bovina (Veloz, 2017).

La realización de estas pruebas se debe emplear los procedimientos diagnósticos aprobado por AGROCALIDAD y realizadas por laboratorios certificados. En este contexto es la contribución de este trabajo de tesis cuyo fin es brindar asesoramiento para crear la base materiales y técnica que permitan en el futuro contar con un adecuado sistema de evaluación del semen congelado en el laboratorio de Andrología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Técnica de Manabí.

VII. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO.

La correcta ejecución del proyecto trajo beneficios a:

- La Universidad Técnica de Manabí, quien es la propietaria del área física en donde se ejecutará el proyecto de titulación.
- Los estudiantes de la Facultad de Ciencias Veterinarias quienes usarán el laboratorio de reproducción para prácticas inseminación artificial y del buen manejo y conservación del semen.
- Y los Docentes e investigadores de la Universidad, ya que mediante estas instalaciones se podrán realizar investigaciones conjuntas que beneficiarán a los productores y a la comunidad.

Beneficiarios Directos.

Docentes e investigadores de la Carrera Medicina Veterinaria, para futuros trabajos investigativos. Estudiantes de la Carrera de Medicina Veterinaria, que reforzaran la parte práctica mediante el conocimiento teórico que han adquirido en las aulas.

La Universidad Técnica de Manabí, mediante estas instalaciones renovadas puede aprovechar para futuros proyectos de vinculación con la sociedad, prácticas para recibir estudiantes que realicen pasantías pre profesionales.

Beneficiarios Indirectos.

Comunidad del Cantón Santa Ana, por medio de capacitaciones sobre la inseminación artificial en el sector ganadero asociado a proyectos de vinculación con la sociedad de parte de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

VIII. METODOLOGÍA.

El proyecto de modalidad trabajo comunitario se ejecutó en el área de producción de la Facultad de Ciencias Veterinarias, en la Parroquia Lodana del cantón Santa Ana. Para la ejecución de este proyecto fue necesaria una observación directa, el cual se diagnosticó las prioridades que requiere el laboratorio del centro andrológico será necesaria la implementación de equipos de acuerdo a lo establecido para la evaluación del semen post congelado y a su vez elaboramos un diagrama de flujo el cual, permite evaluar los procedimientos de un laboratorio de biotecnologías reproductivas en la recolección, evaluación y conservación de las dosis de semen congelado.

El asesoramiento técnico para el laboratorio del centro andrológico servirá para facilitar el manejo de sistema de evaluación de semen post congelado. Los beneficiarios de este trabajo serán:

La Universidad Técnica de Manabí, quien es la propietaria del área física en donde se ejecutará el proyecto.

Los estudiantes de la Facultad de Veterinaria quienes usarán el laboratorio de biotecnologías reproductivas para prácticas de conservación del semen e inseminaciones artificiales en el ganado bovino.

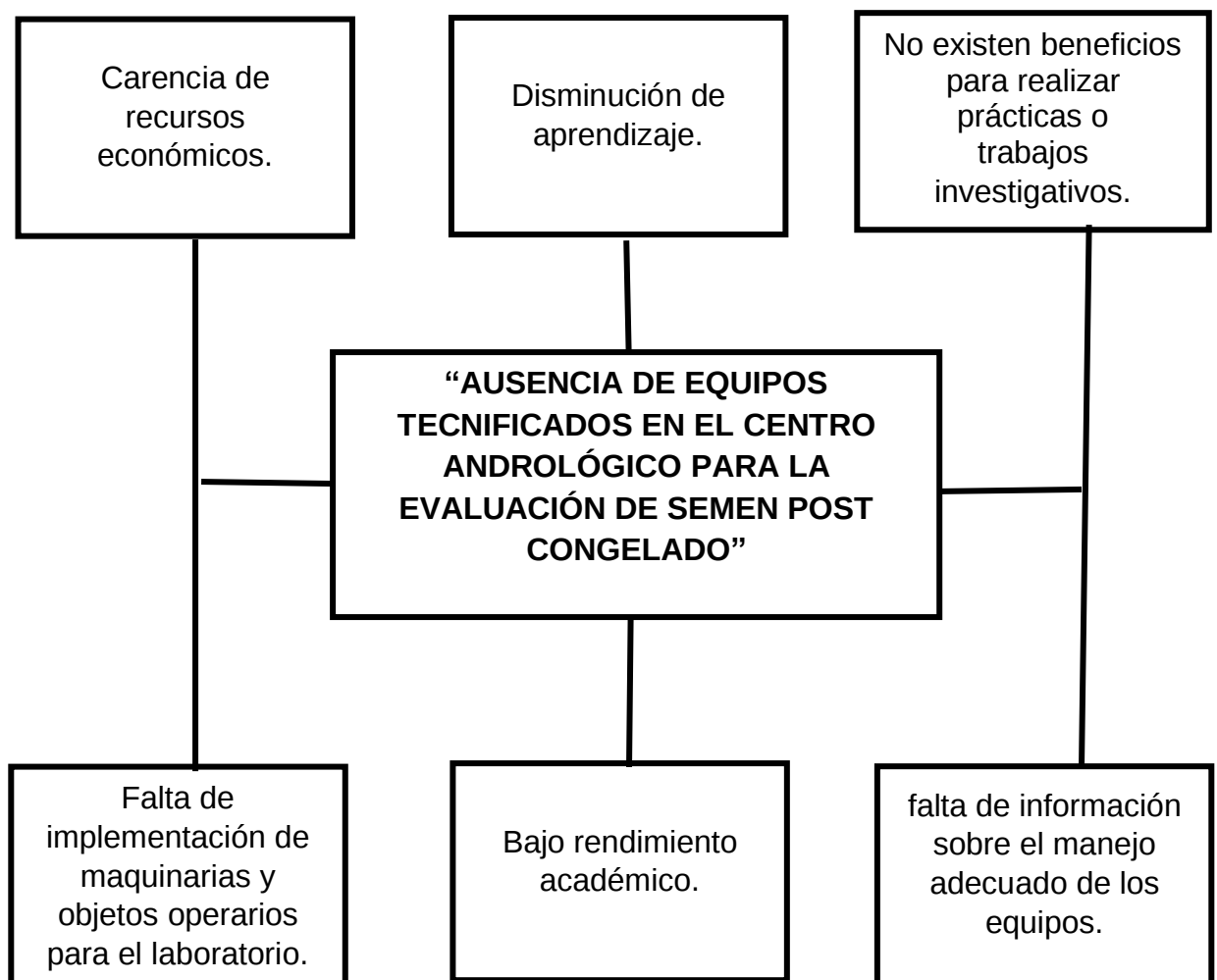
Y los pobladores de la provincia y del país, ya que con estas instalaciones se podrán realizar investigaciones conjuntas que beneficiarán a los productores y a la comunidad.

8.1. MATRIZ DE INVOLUCRADOS

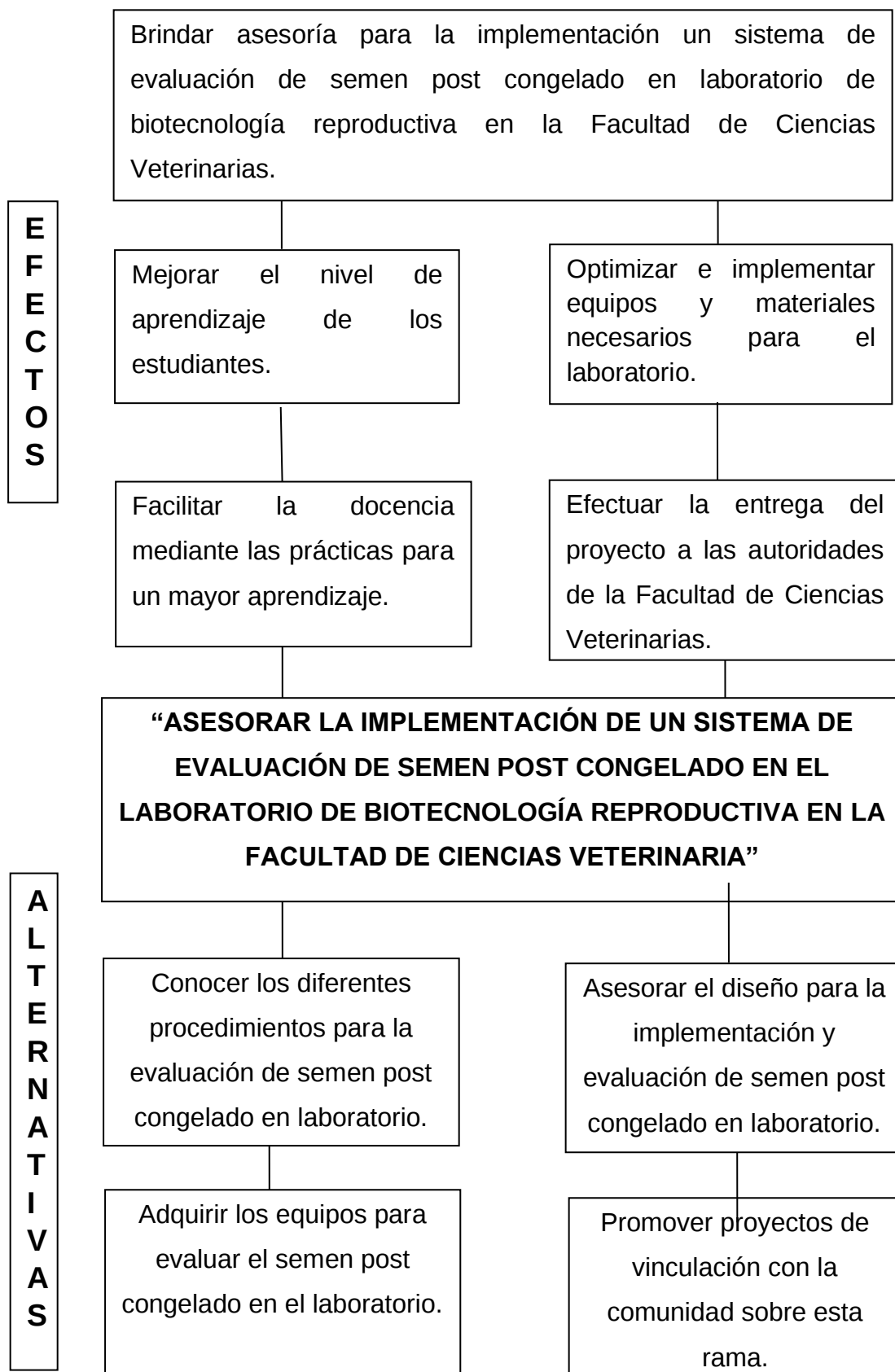
GRUPOS	INTERESES	PROBLEMAS PREVISTOS	RECURSOS Y MANDATOS	INTERESES DEL PROYECTO	CONFLICTOS POTENCIALES
Autoridades De la FCV. De la UTM	Proporcionar instalaciones adecuadas y equipos necesarios para los estudiantes.	No obtener las instalaciones y equipos necesarios en el tiempo previsto.	Mayor control sobre el bienestar de los estudiantes, personal del área y de los animales.	Aumentar el nivel de aprendizaje en los estudiantes.	Problemas de falta de información sobre el manejo adecuado de los equipos.
Docentes de la FCV.	Implementar prácticas de campo como metodologías de estudio para los estudiantes.	Falta de conocimientos en el manejo tecnificado de los equipos del laboratorio y mantenimiento de los mismos.	Asesorar el manejo de los equipos del laboratorio para la evaluación de semen post congelado en laboratorio de reproducción.	Facilitar la enseñanza de la catedra mediante la práctica.	Insuficiente rendimiento académico.
Estudiantes de la FCV.	Aumentar el aprendizaje en el centro andrológico.	Falta de interés en la asignatura impartida por el docente.	Crear confort durante la estancia en el área de producción.	Optimizar los conocimientos y la experiencia desarrollados durante clases en prácticas.	Falta de recursos que conllevan a un déficit de prácticas de campo.

Empleados del área de investigación científica de la FCV.	Mejorar el desempeño en el manejo del laboratorio.	Afectaciones por lesiones y patologías epidemiológicas .	Asesoramiento sobre el manejo de los equipos.	Proporcionar las capacitaciones adecuadas para que conozcan sobre el funcionamiento y mantenimiento de los equipos.	Falta de conocimientos.
--	--	--	---	---	-------------------------

8.2. ÁRBOL DEL PROBLEMA.



8.3. ARBOL DE OBJETIVOS.



8.4. MARCO LÓGICO.

OBJETIVO	INDICADORES	VERIFICADORES	SUPUESTOS
Fin Asesorar la implementación de un sistema de evaluación de semen post congelado en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva en la Facultad de Ciencias Veterinarias.	El beneficio de becas estudiantiles para la ejecución de proyectos en el laboratorio de reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinaria ubicada en Lodana.	*Informes de los tesisistas del proyecto de acuerdo al cronograma establecido. *Certificaciones del docente tutor del proyecto. *Oficios emitidos por las autoridades de la facultad de ciencias veterinarias.	No existen equipos para realizar prácticas de manejo y conservación del semen.
Propósitos Asesorar la implementación del sistema de evaluación de semen post congelado en el laboratorio de reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias.	Generar áreas adecuadas para mejorar el rendimiento académico de los estudiantes mediante las prácticas, donde podrán ejecutar lo aprendido en el aula de clases.	*Determinación e implementación de equipos en el laboratorio andrológico. *Fotos, informes, supervisores.	*Falta notable de los equipos térmicos en el área.
Componentes 1.- Adquirir los equipos para evaluar el semen post congelado en el laboratorio.	Se recomienda realizar un buen mantenimiento de la máquina TK 5000 cada cierto tiempo.	*Observación directa. *Facturas. *Fotografías.	Falta de recursos.
2.- Conocer los procedimientos para la evaluación de semen post congelado e implementar un diagrama de flujo que permita valorar las dosis de semen posterior al proceso de congelación.	Se recomienda investigar técnicas modernas de conservación del semen.	*Gráficos.	Falta de recursos.

3.- Efectuar la entrega de la obra en el laboratorio de biotecnologías reproductivas de la Facultad de Medicina Veterinaria a la autoridad del establecimiento.			Contratiempo por situación de la pandemia.
Actividades	Costos	*Facturas.	*Ninguno.
1.Compra de máquina congeladora de semen marca TK modelo 5000.	8000.00		
2.- realizar una revisión bibliográfica de los principales procedimientos para evaluar semen post congelado y elaboración de diagrama de flujo del proyecto.	Ninguno.	Observación directa.	*Ninguno.
3.- Entrega de la obra a las autoridades de la FCV.	Viernes 26 de febrero del 2021.	*Observación directa.	*Ninguno

IX. RECURSOS A UTILIZAR.

A continuación, se detallan los recursos humanos y materiales utilizados para la adecuación del laboratorio de reproducción:

9.1. RECURSOS HUMANOS.

- 2 egresados tesistas.
- 1 tutor de tesis.
- 1 revisor de tesis.
- Personal técnico para la construcción de la máquina de congelación del semen marca TK modelo 5000 (total 3 obreros).

9.2. RECURSOS MATERIALES.

- Documentos de apoyo, bibliografía.
- Papel Bond A4.
- Carpetas.

9.3. RECURSOS FINANCIEROS.

Beca de titulación adquirida a través de la Universidad Técnica de Manabí.

X. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS OBTENIDOS EN LA SOLUCIÓN DEL PROBLEMA.

El proyecto se ejecutó en el laboratorio de biotecnologías reproductivas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, en la Parroquia Lodana del cantón Santa Ana. Para su ejecución fue necesaria una observación directa, el cual se diagnosticó las prioridades que requiere el laboratorio, para poder implementar un sistema de evaluación de semen post congelado y la adecuación del laboratorio.

El asesoramiento técnico para la implementación del sistema de evaluación del semen post congelado en el laboratorio de reproducción sirve para lograr una mejor área didáctica para practicas reproductivas.

Mediante el progreso de los componentes establecidos en el cronograma se llevó a cabo las siguientes actividades:

10.1. Compra de la máquina de congelación del semen.



Figura 3.- Máquina congeladora de semen marca TK modelo 5000.

Se realizo la compra de una máquina congeladora de semen de la marca TK modelo 5000 proveniente de Brasil de la empresa ESCOVET, por medio de la

beca obtenida por la universidad técnica de Manabí, la cual permite realizar estudios en óptimas condiciones de congelación de los espermatozoides de cientos de especies animales permitiendo una velocidad de enfriamiento para que la muerte celular debido a la formación de hielo intracelular y soluciones hipertónicas se reduzca al mínimo.

10.2. Técnicas de evaluación del semen post congelación.

Estos equipos, reactivos e insumos descartables serán utilizados para efectuar las siguientes pruebas del semen recolectado y congelados:

- Técnica de motilidad espermática.
- Técnica de viabilidad espermática.
- Evaluación de la morfología espermática.
- Prueba de permeabilidad de la membrana espermática.
- Número de espermatozoides con motilidad progresiva.

10.3. Diseño del diagrama de flujo de la propuesta del sistema de evaluación de la calidad del semen congelado.

Una vez indicadas las diferentes pruebas que serán utilizadas en el sistema de evaluación de la calidad del semen congelado, se propuso el siguiente procedimiento de control y el diagrama de flujo de esta actividad técnica.



Figura 4.- Diagrama del trabajo de titulación correspondiente a los procedimientos técnicos que se deben de llevar en un laboratorio de biotecnologías reproductivas para la recolección, evaluación y conservación de las dosis de semen congelado.

XI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

11.1. CONCLUSIONES.

Luego de la finalización del presente trabajo de titulación se llegó a las siguientes conclusiones:

- La implementación de la máquina congeladora de semen marca TK modelo 5000 presenta una gran ventaja en el proceso de preservación y almacenamiento de las dosis de semen congelado, ya que permite regular la valoración de la funcionalidad e integralidad de las pajuelas de semen fresco.
- La adquisición de equipos para el laboratorio de biotecnologías reproductivas permitirá un mejor trabajo de los especialistas y a su vez favorecerá a la formación académica de los estudiantes de la FCV.
- Los procedimientos para la evaluación del semen post congelado permiten determinar la calidad después de la descongelación de cada dosis seminal, ya que proporcionan información acorde a la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados.
- La implementación de un diagrama de flujo de los procedimientos para la evaluación de las dosis de semen posterior al proceso de congelación permitirá contar con una guía didáctica que facilite a la comunidad académica a conocer los diferentes procedimientos que conllevan al procesamiento de una muestra con el fin de garantizar la calidad de las dosis seminales.

11.2. RECOMENDACIONES.

Luego de la finalización del presente trabajo de titulación se llegaron a las siguientes recomendaciones:

- Se recomienda realizar una adecuación de equipos para el laboratorio de biotecnologías reproductivas para contar con un área óptima para la investigación y prácticas de la comunidad universitaria.
- Promover las respectivas tareas de limpieza y mantenimiento de la máquina congeladora de semen con la finalidad de evitar el deterioro temprano de los equipos implementados.
- Ejecutar más proyectos que se vinculen con el laboratorio de reproducción, ya sean trabajos de titulación, proyectos investigativos, proyectos experimentales, para continuar mejorando el área y tener un sofisticado escenario que permita realizar de manera correcta prácticas a los estudiantes.

XII. SUSTENTABILIDAD Y SOSTENIBILIDAD.

12.1. SUSTENTABILIDAD.

El presente trabajo de titulación nació de la necesidad de contar con un Laboratorio de biotecnologías reproductivas para la Facultad de Ciencias Veterinarias; por ello los estudiantes: Alex Guillermo Cedeño Espinales y Jorge Andrés Seme Giler propusieron el proyecto **“Asesoramiento técnico para la implementación de un sistema de evaluación de semen post congelado en el Laboratorio de reproducción”** como parte de la modalidad de titulación de trabajo comunitario.

Con el asesoramiento se diseñó e implementó la adquisición de una máquina marca TK modelo 5000 para la congelación del semen, la cual permitirá que la Facultad cuente con un área de acopio de pajuelas para realizar inseminaciones artificiales, de esta manera los estudiantes de veterinaria puedan realizar las prácticas de campo que complementen la parte teórica impartida por los docentes.

La participación de este proyecto permite a que los autores apliquen los conocimientos que han adquirido a lo largo de la carrera y obtenida desde la práctica, que demuestren soluciones y competencias que los permita desarrollarse como futuros Médicos Veterinarios Zootecnistas.

12.2. SOSTENIBILIDAD.

Equipamiento y asesoramiento que se le brindó al Laboratorio de biotecnologías reproductivas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UTM, se encuentra implementado de manera eficiente, permitiendo un correcto almacenamiento de las pajuelas de semen. Además de acondicionarla por parte de criterios técnicos, se han adquirido materiales de buena calidad y acorde al capital obtenido para la construcción de la máquina marca TK para la congelación del semen modelo 5000 correspondiente a la tesis, la cual posee una durabilidad entre (aproximadamente 15 y 20 años) siempre y cuando se dé un mantenimiento adecuado.

XIII. PRESUPUESTO.

TEMA: ASESORAMIENTO TÉCNICO PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE EVALUACIÓN DE SEMEN POST CONGELADO EN EL LABORATORIO DE REPRODUCCIÓN.

PRESUPUESTO TESIS				
Rubro	Unidad	Cantidad	Precio Unit.	Total, USD
Presupuesto Beca				
Sistema CASA para evolución espermática. El sistema automatizado para el análisis de semen por ordenador destaca por la integración de los análisis más avanzados para valorar la funcionalidad de los espermatozoides. La concentración y la motilidad, así como la integridad y viabilidad espermática pueden ser evaluadas con precisión y rapidez analizado hasta 1000 cédulas por campo, para la evaluación objetiva y completa del semen. Todas las imágenes y los datos se almacenan para su posterior revisión. El informe de análisis se puede generar como una copia impresa o un archivo digital. MODULOS Morfología y Morfometría, Modulo Viabilidad				
EQUIPO DE MANEJO DE CURVA DE CONGELACIÓN FASE 4	Parte 1	1	4000.0	4000.0
EQUIPO DE MANEJO DE CURVA DE CONGELACIÓN FASE 4	Parte 2	1	4000.0	4000.0
Total				\$ 8000.0

AUTORES:

Cedeño Espinales Alex Guillermo

CI: 1314318963

Seme Giler Jorge Andrés

CI: 1312360371

TUTOR: Dr. Rodolfo Pedroso Sosa, PhD.

XIV. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

Las actividades realizadas en el trabajo de titulación se desarrollaron desde octubre del 2019 hasta febrero del 2021 de acuerdo a los objetivos específicos del proyecto:

ACTIVIDADES	MESES																
	Oct-19	Nov-19	Dic-19	Ene-20	Feb-20	Mar-20	Abr-20	May-20	Jun-20	Jul-20	Ago-20	Sep-20	Oct-20	Nov-20	Dic-20	Ene-21	Feb-21
ELABORACIÓN DEL PROYECTO	X	X															
CORRECCIÓN DEL BORRADOR		X															
APROBACIÓN DEL PROYECTO		X															
ACREDITACIÓN DE LA BECA												X					
COMPRA DE MATERIALES													X	X	X		
CONTRATO DE MANO DE OBRA													X	X	X		
ENTREGA DE OBRA																X	X
ELABORACIÓN DE LA TESIS												X	X	X	X	X	
FINALIZACIÓN DE LA TESIS																	X

XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Anchatuña, C. (2017). EFECTO DE DISTINTOS TIEMPOS DE EQUILIBRIO SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA PRE Y POST-CONGELACIÓN DE SEMEN BOVINO DE TOROS REPRODUCTORES HOLSTEIN FRIESIAN. *UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR*, 4-9.
2. Cabodevil, J. (2015). *Evaluación de semen bovino congeleado*. Obtenido de https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/evaluacion-semen-bovino-congeleado-t29765.htm?fbclid=IwAR3hX9k5hrHXkLOVDzaHciLZ6TI-weNhgmwc_FZliypHsTkC72QsJ5f76g
3. Carpio, S. (2015). *EVALUACIÓN DE DOS DILUYENTES PARA LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN BOVINO*. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7955/1/UPS-CT004815.pdf>
4. Castro, K. (2019). MÉTODOS MODERNOS DE EVALUACIÓN SEMINAL EN EQUINOS. *Universidad Cooperativa de Colombia*, 3-5.
5. Cedeño. (2019). *Santa Ana GAD Municipal*. Obtenido de <http://santaana.gob.ec/santa-Ana/situacion-geografia/>
6. Curbelo, R. (2013). *RELEVAMIENTO DE LABORATORIOS DE PROCESAMIENTO DE SEMEN BOVINO*. Obtenido de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/2730/1/FV-29987.pdf>
7. Díaz, N. (2018). *Protocolos de criopreservación de semen bovino*. Obtenido de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/9496/T636.08245%20D542.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
8. Gomez, V. (2015). Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 11-16.
9. Hernandez, D. (2015). Aplicación del test hipoosmótico (host) en la evaluación de calidad seminal en ovinos criollos de pelo colombiano. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 17-19.
10. Kumar, U. (2015). Assessment of semen quality in pure and crossbred Jersey bulls. *Veterinary World*, 33-54.
11. Mejía, J. (2017). *Evaluación pre y post congelación del semen obtenido con vagina artificial y electroeyaculador en el ganado criollo*. Obtenido de <https://pdfs.semanticscholar.org/b81f/a5f7ff6d4d7fc73be6a452bc8653017b5f14.pdf>
12. Moncayo, S. (2016). Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de criopreservación.
13. Quintero. (2016). El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *Journal of Veterinary Andrology*, 8-17.

14. Ribeiro, A. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Universidad Estadual Paulista, Botucatu, Brasil*, 1-3.
15. Rivera, M. (2016). CRIOPRESERVACION DE CELULAS REPRODUCTIVAS. *Prosenga*, 23-25. Obtenido de <http://manualbiotecnologiareproductiva.blogspot.com/p/tecnicas-de-reproduccion.html>
16. Saavedra, G. (2018). Conservación seminal en toros Cebú. Efecto de la retirada del plasma seminal y su posterior incorporación sobre la calidad espermática en los protocolos de criopreservación. *Universidad De Zaragoza*, 18-25.
17. Valverde, A. (2018). *Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal*. Obtenido de <https://www.redalyc.org/jatsRepo/437/43755165018/html/index.html>
18. Velasco. (2008). La inseminación artificial y su efecto sobre los índices de productividad parcial en fincas ganaderas de doble propósito. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 278-283.
19. Veloz, D. (2017). Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial. *UNIVERSIDAD DE CUENCA*, 17-24.

ANEXOS.



ANEXO 1,2.- Planificación del proyecto de titulación.



ANEXO 3,4.- Compra de la máquina congeladora de semen marca TK modelo 5000.



ANEXO 5,6.- Desembalaje y revisión de la máquina congeladora.



ANEXO 7,8.- Explicacion del funcionamieto de la máquina congeladora de semen.



ANEXO 11, 12.- Culminación de la obra de tesis.



ANEXO 13.- Entrega de la obra con la presencia de las autoridades de la FCV.



ANEXO 14, 15.- Prueba de evaluación del semen post congelado.



ANEXO 16.- Análisis e interpretación de los resultados.