

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES.**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**TRABAJO DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

TÍTULO: “Manual de Crioconservación de Semen de Mamíferos Domésticos en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi” 2013.

AUTOR

Ivonne Alexandra Villacis Mora

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Cristian Arcos

LATACUNGA – ECUADOR 2014

AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS

Latacunga, 21 de Enero del 2014

Dr. MSc.

Enrique Estupiñán

**DIRECTOR DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES.**

Presente.-

De mi consideración.

Reciba un cordial saludo y a la vez deseándole éxitos en sus funciones como Director Académico.

En mi calidad de director de tesis titulada **“MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”2013**. Propuesto por la egresada Ivonne Alexandra Villacis Mora, como requisito previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista, de acuerdo con el Reglamento de Títulos y Grados, considero que el trabajo mencionado reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del Tribunal Examinador que se designe.

Particular que pongo en su conocimiento para los fines legales pertinentes.

Atentamente,

Dr. Cristian Arcos.

Director de Tesis

CARTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TESIS

En calidad de miembros del tribunal de grado aprueban el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi y CAREN por cuanto, la postulante con el tema de tesis **“MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”**, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los meritos suficientes para ser sometido al acto de defensa de tesis.

Por lo antes expuesto se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Dr. Enrique Estupiñán

Presidente del tribunal.

Dra. Marcela Andrade

Miembro del tribunal.

Dra. Blanca Villavicencio

Opositora del tribunal.

AUTORIA

Yo, Ivonne Alexandra Villacis Mora declaro que el trabajo aquí descrito, la responsabilidad de la investigación, ideas expuestas, resultados y conclusiones de la presente tesis es de mi autoría y que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica de Cotopaxi puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido con la ley de propiedad intelectual, por su reglamentó y por la normativa institucional vigente.

Ivonne Alexandra Villacis Mora

C.I. 0503043309

AUTORA

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi agradecimiento a:

Dios por darme la sabiduría necesaria en todo momento y bendecirme con la posibilidad de caminar a su lado durante toda mi vida.

A mis padres por brindarme el apoyo incondicional y su sabiduría para alcanzar mis metas, por estar conmigo en los aciertos y desaciertos de mi vida, por ello una gratitud inmensa y un Dios les pague infinito por la confianza y el sacrificio puesto en mí.

A mi hijo Sebastián por ser la razón de mi vida y el motor que me impulsa para siempre continuar, por ser la más grande inspiración de mis sueños y mis metas.

A mis hermanas Ximena y Mayra por su apoyo incondicional y sus consejos en el momento oportuno.

A la “Universidad Técnica de Cotopaxi”, a sus autoridades y a todos mis profesores que supieron impartirme sus conocimientos académicos, permitiéndome realizar los estudios para mi formación en esta noble institución.

Expreso mi sincero agradecimiento a mi Director de Tesis Dr. Cristian Arcos por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia y a la Dra. Paola Lazcano por la orientación profesional y el tiempo dedicado a lo largo del mismo.

Ivonne.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO

Por ser luz en mi camino en cada paso que doy, guiándome y dotándome de la sabiduría necesaria para llevar a cabo cada uno de mis objetivos y alcanzar mi meta.

A MI HIJO

Sebastián por ser el regalo más maravilloso que Dios y la vida me pudo dar, eres el ser que le devolvió el sentido a mi vida, el más grande motivo de mi superación personal y profesional, porque con tu presencia llenaste mi vida de ilusiones, esperanzas y el anhelo de un futuro mejor para los dos.

A MIS PADRES

Quienes pusieron su confianza en mí, brindándome su apoyo incondicional y sus sabios consejos con el afán de que me supere y logre todo lo que me he propuesto, gracias a ello, hoy he llegado a alcanzar esta meta y les retribuyo todo el esfuerzo y sacrificio puesto en mí.

A MIS HERMANAS

Por su ayuda y apoyo incondicional que me brindaron en los momentos que más lo necesité, mis sinceros agradecimientos.

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS/AS.

Que de una u otra forma me ayudaron y participaron para que lograra el presente éxito profesional. Gracias por sus palabras de aliento y fe en mí.

A MIS CATEDRÁTICOS.

Por los consejos y conocimientos que me impartieron dentro y fuera de las aulas.

Ivonne Alexandra Villacis Mora

DECLARACIÓN EXPRESA

La responsabilidad del contenido de este proyecto de tesis, me corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual del mismo a la “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”

.....

Ivonne Alexandra Villacis Mora

ÍNDICE DE PRELIMINARES

Portada.....	i
AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS.....	ii
CARTA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE TESIS.....	iii
AUTORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
DECLARACIÓN EXPRESA.....	vii
ÍNDICE DE PRELIMINARES.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ÍNDICE DE CUADROS.....	xv
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
AVAL DE TRADUCCIÓN.....	xix
INTRODUCCIÒN.....	xx

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1 Manuales.....	1
1.1.1 Manual de Funciones.....	1
1.1.2 Los principios generales de la Norma Iso/Iec 17025-2000 para el Funcionamiento de laboratorios:.....	2
1.1.3 Tipos de Manuales.....	2
1.1.4 Pasos para Elaborar un Manual.....	4
1.1.5 Contenidos de un Manual.....	5

1.2 El manual como medio de comunicación	6
1.3 Objetivos de los manuales	6
1.4 Ventajas y desventajas de los manuales	7
1.4.1 Ventajas	7
1.4.2 Desventajas	7
1.5 Guía para la elaboración del manual de procedimientos	8
1.5.1 Concepto	8
1.5.2 Análisis y diseño de procedimientos	8
1.5.3 Delimitación del Procedimiento.....	9
1.5.4 Recolección de la Información	9
1.5.4.1 Las técnicas que usualmente se utilizan para recabar información necesaria ...	9
1.5.5 Análisis de la Información y Diseño del Procedimiento.....	10
1.6 Elementos que integran el manual de procedimientos.....	10
1.6.1 Identificación.....	11
1.6.2 Índice	11
1.6.3 Introducción	11
1.6.4 Objetivos del Manual	12
1.6.5 Desarrollo de los Procedimientos.....	12
CAPÍTULO II.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Características del área (Laboratorio)	13
2.1.1 Ubicación Política y Geográfica	13
2.1.2 Coordenadas Geográficas.....	14
2.1.3 Datos Meteorológicos	14
2.2 Materiales	14
2.2.1 Recursos Humanos	14
2.3 Diseño Metodológico.....	15
2.3.1 Tipo de Investigación.....	15
2.3.1.1 Investigación Descriptiva	15
2.3.1.2 Investigación Exploratoria.....	16

2.4 Métodos y Técnicas	16
2.4.1 Método Deductivo	16
2.4.2 Método Inductivo	16
2.4.3 Método Analítico	17
2.4.4 Método No Experimental	17
2.5 Técnicas	17
2.5.1 Fichaje	17
2.7 Diseño de la Investigación	18
2.6.1 Preguntas Directrices	18
MANUAL	19
DIRECTORIO INSTITUCIONAL	20
INTRODUCCIÓN	22
ANTECEDENTES.....	23
3 PREPARACION DE UN LABORATORIO PARA REPRODUCCIÓN.....	25
3.1 Normas de trabajo para un laboratorio de reproducción.....	25
3.1.1 Hábitos Personales.....	25
3.1.2 Lavado Quirúrgico de Manos e Indumentaria.....	25
3.1.3 Uso de guantes estériles	26
3.1.4 Uso de Mascarillas.....	26
3.2 Buenas prácticas de laboratorio	26
3.2.1 Organización del trabajo en el Laboratorio.....	27
3.3 Características de los equipos.....	27
3.4 PRÁCTICA N° 01 COLECCIÓN DE SEMEN.....	42
3.4.1 Colección de semen en bovinos	43
3.4.1.1 Vagina Artificial	43
3.4.1.1.1 Materiales:	43
3.4.1.2 Electro eyaculador	44
3.4.1.2.1 Materiales:	44
3.4.1.3 Lavado Epidídimo.....	46
3.4.1.3.1 Materiales:	46

3.4.1.3.2 Metodología:.....	47
3.4.2 Colección de semen en ovinos	48
3.4.2.1 Vagina Artificial	48
3.4.2.1.1 Materiales:	48
3.4.2.1.2 Metodología:.....	48
3.4.2.2 Electro eyaculador	49
3.4.2.2.1 Materiales:	49
3.4.2.3 Lavado Epidídimo.....	50
3.4.2.3.1 Materiales:	50
3.4.2.3.2 Metodología:.....	51
3.4.3 Colección de semen en porcinos	52
3.4.3.1 Por Presión	52
3.4.3.1.1 Materiales:	52
3.4.3.1.2 Metodología:.....	53
3.4.4.1 Vagina Artificial	54
3.4.4.1.1 Materiales:	54
3.4.4.1.2 Metodología:.....	55
3.4.4.2 Electro eyaculador	56
3.4.4.2.1 Materiales:	56
3.4.4.2.2 Metodología:.....	56
3.4.5 Colección de semen en conejos	57
3.4.5.1 Vagina Artificial	57
3.4.5.1.1 Materiales:	57
3.4.6 Colección de semen en cuyes	59
3.4.6.1 Lavado Epidídimo.....	59
3.4.6.1.1 Materiales:	59
3.4.6.1.2 Metodología:.....	59
3.4.7 Colección de semen en caninos	61
3.4.7.1 Método Manual.....	61
3.4.7.1.1 Materiales:	61

3.4.7.1.2 Metodología:.....	61
3.5 PRÁCTICA N° 02.....	62
3.5.1 Procesamiento del semen	62
3.5.1.1 Introducción.....	62
3.5.2 Objetivos	62
3.5.3 Materiales:.....	63
3.5.4 Equipos:	63
3.5.5 Reactivos-Soluciones:	63
3.5.6 Metodología:	63
3.5.6.1 Características Macroscópicas	64
3.5.6.1.1 Volúmen.-.....	64
3.5.6.1.2 Color y densidad.-	65
3.5.6.1.3 pH.-	66
3.5.6.2 Características Microscópicas.....	66
3.5.6.2.1 Motilidad o movimiento en masa.-	66
3.5.6.2.2 Motilidad individual progresiva.-	68
3.5.6.2.3 Morfología.-.....	69
3.5.6.3 Métodos para calcular la concentración o densidad	71
3.6 PRACTICA N° 03.....	72
3.6.1 Introducción	72
3.6.2 Objetivos	73
3.6.3 Crioconservación de semen bovino, ovino, caprino con andromed.....	74
3.6.3.1 Materiales:.....	74
3.6.3.2 Reactivos-Soluciones:	74
3.6.3.3 Equipos:	74
3.6.3.4 Metodología:	74
3.6.4 Crioconservación de semen en conejo, cuy, caninos con triladyl.....	76
3.6.4.1 Materiales:.....	76
3.6.4.3 Equipos:	77
3.6.5 Crioconservacion de semen en porcinos con x-cell.....	80

3.6.5.1 Materiales:.....	80
3.6.5.2 Reactivos-Soluciones:	80
3.6.5.3 Equipos:	80
3.6.5.4 Metodología:	80
CONCLUSIONES	82
RECOMENDACIONES.....	83
BIBLIOGRAFIA	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación de la Investigación.....	13
Figura 2: Partes de la Vagina Artificial	28
Figura 3: Proceso de llenado de la Vagina Artificial	29
Figura 4: Microscopio de Contraste de Fases.....	32
Figura 5: Partes del Microscopio de Contraste de Fases	33
Figura 6: Tanque de nitrógeno líquido.....	41
Figura 7: Recolección del Semen en bovinos	44
Figura 8: Recolección del semen Electroeyaculador	46
Figura 9: Recolección del Semen en porcinos.....	53
Figura 10 : Recolección de Semen en Conejos.....	58
Figura 11: Movimiento en masa de espermatozoides	67
Figura 12: Evaluación de la motilidad individual (A, B, C.).....	68
Figura 13: Algunas anormalidades frecuentes en los espermatozoides	70
Figura 14: Conteo de espermatozoides con cámara de newbauer.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Volumen de semen de diferentes especies	64
Cuadro 2: Densidad y Color del semen.....	65
Cuadro 3: Clasificación de motilidad en masa del semen	67
Cuadro 4: Calificación descriptiva del movimiento en masa.....	67
Cuadro 5: Evaluación descriptiva de la motilidad individual	68
Cuadro 6: Morfología Espermática	70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Ficha De Trabajo	87
Anexo 2. Registro de las Anormalidades de los Espermatozoides.....	88
Anexo 3. Plan de Renovación de los Equipos	89

RESUMEN

El manual de crioconservación de semen de mamíferos domésticos tiene mucha importancia ya que es considerado como un documento de consulta por contener información y actividades que se deben llevar a cabo durante un proceso.

Es una herramienta de fácil modificación de acuerdo al crecimiento y a las nuevas maneras de operación, así como a los cambios que se susciten en esta área de estudio.

El objetivo principal de la elaboración del manual de criopreservación de semen de los animales domésticos es fortalecer los conocimientos ya que constituye una guía para los estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria en el desarrollo de las prácticas dentro del Laboratorio de Reproducción y el uso correcto de los equipos.

El primer capítulo contiene la introducción, la revisión de literatura sobre la elaboración del manual.

El segundo capítulo explica la metodología usada para el desarrollo del manual, el lugar donde será utilizado, los recursos necesarios y las preguntas directrices.

El tercer capítulo es la propuesta del manual en el cual constan los equipos que serán usados para la realización de las diversas prácticas sobre la crioconservación de semen en las distintas especies, cumpliendo con los requerimientos necesarios y la organización establecida por la Universidad y la Carrera de Medicina Veterinaria.

ABSTRACT

The manual of cryopreservation of semen of domestic animals has a lot of importance since it is considered as a consultation document to contain information and activities that should be carried out in this process.

It is a tool of easy modification according to the growth and to the new operation ways, as well as the changes that are given in this study area.

The main objective of the elaboration of the manual of cryopreservation of semen of the domestic animals is to strengthen the knowledge since it constitutes a guide for the students of the Veterinary Medicine Career in the development of the practices inside the Laboratory of Reproduction and the correct use of the equipment.

The first chapter contains the introduction, the literature review on the elaboration of the manual.

The second chapter explains the methodology used for the development of the manual, the place where it will be used, the necessary resources and the questions guidelines.

The third chapter is the manual which consists of the equipment that will be used for the realization of the diverse practices on the cryopreservation of semen in the different species, fulfilling the necessary requirements and the organization settled down by the University and the Veterinary Medicine Career.

AVAL DE TRADUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En base a la necesidad a nivel de laboratorios, en la actualidad la Universidad ha visto necesario el desarrollo de manuales ya que no existe la información necesaria para despejar cada una de las inquietudes de los estudiantes, los mismos que serán de mucha utilidad para realizar las prácticas de laboratorio, para el desarrollo de las investigaciones que se vienen dando en el adelanto de la carrera y así contribuir con nuevos conocimientos, los mismos que serán muy útiles.

El desarrollo de este manual dará la posibilidad de crear estudios multi-céntricos que puedan llevar a un mejor nivel científico en un mundo globalizado y el desarrollo de la investigación como una herramienta fundamental, a la cual todos los estudiantes deberán tener acceso.

Es muy importante establecer la información en manuales, los cuales son las guías básicas para realizar cada una de las actividades que se llevan a cabo dentro del laboratorio.

El manual de crioconservación de semen de mamíferos domésticos se empleará en las siguientes especies: Bovinos, Ovinos, Porcinos, Caprinos, Conejo, Cuy, Caninos facilitando así la realización de las actividades que se llevan a cabo dentro del laboratorio en cada proceso

La importancia de los manuales viene implícita en el contenido, ya que al ser documentos de consulta para todos los usuarios, conocen desde el principio, lo que se debe hacer dentro de un laboratorio, como lo que no se debe hacer.

Es una herramienta de consulta, donde la información puede modificarse de acuerdo al crecimiento y a las nuevas maneras de operación, así como los cambios que se susciten en esta área de estudio.

Este estudio está enfocado en la necesidad de desarrollar un manual sobre la Crioconservación de Semen de Mamíferos Domésticos, ya que las fuentes bibliográficas existentes y los materiales didácticos disponibles son escasos para el estudiante; y considerando que en lo teórico-práctico es fundamental para cumplir algunos objetivos los mismos que persiguen una serie de procedimientos y otras herramientas que permitan al estudiante aplicar los estudios cuantitativos y cualitativos en lo referente a reproducción.

El manual de Crioconservación de Semen de Mamíferos Domésticos ofrecerá el apoyo a los estudiantes y docentes de la carrera para el desarrollo de nuevos conocimientos aplicando la teoría conjuntamente con la práctica.

El desarrollo de este manual constituye una novedad científica debido a que representa un medio de comunicación y por ello tiene como propósito instruir a las personas aspectos como: funciones, relaciones, procedimientos y normas.

Se considera una relevancia social y es factible la realización de este Manual ya que asegura la continuidad y coherencia en los procedimientos y normas a través del tiempo debido a que su utilidad se basa en:

- ✓ Los manuales permitirán ofrecer una descripción actualizada, clara y precisa para que así el usuario pueda ayudarse, comprender y guiarse sobre el tema de estudio y así pueda evitar a la larga la distorsión de información.
- ✓ Un manual es una publicación que incluye lo más sustancial de una materia, es un documento técnico que intenta dar asistencia a sus usuarios.
- ✓ Este manual será una recopilación en forma de texto, que recoge minuciosa y detalladamente las instrucciones que se deben seguir para realizar una determinada actividad, de una manera sencilla, para que sea fácil de entender, y permita al lector, desarrollar correctamente la actividad propuesta.

Es por ello que como alumna de una carrera teórico-práctica, emprendo en la realización de este manual con la finalidad de obtener mi título de Médico Veterinario Zootecnista.

LOS OBJETIVOS FUERON:

GENERAL.

- Elaborar un Manual de Crioconservación de Semen de Mamíferos Domésticos en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción en la Universidad Técnica de Cotopaxi.

ESPECIFICOS.

- Elaborar un material de consulta para proporcionar, en forma ordenada, la información básica de la organización y funcionamiento del Laboratorio como una referencia obligada para lograr el aprovechamiento de los recursos y el desarrollo de las actividades encomendadas.
- Determinar las características y funcionamiento de los equipos que se utilizarán para la crioconservación de semen.
- Elaborar un plan de renovación que permita determinar con criterio económico la vida óptima de un equipo de Laboratorio.

CAPÍTULO I

1. REVISIÓN DE LITERATURA

El presente capítulo contiene la información sobre la elaboración de un manual, los tipos de manuales, los pasos para desarrollar un manual, el contenido de una manual, objetivos de los manuales, las ventajas y desventajas de los mismos.

1.1 Manuales

Los manuales son una de las herramientas más eficaces para transmitir conocimientos y experiencias, porque ellos documentan la tecnología acumulada hasta ese momento sobre un tema. (Álvarez, 1996)

El manual describe la organización formal, mencionado, para cada puesto de trabajo, la misión del mismo, funciones, autoridad y responsabilidades. (Molina, 2007)

1.1.1 Manual de Funciones

El manual de funciones es un instrumento de trabajo que contiene el conjunto de normas y tareas que desarrolla cada funcionario en sus actividades cotidianas y será elaborado técnicamente basados en los respectivos procedimientos, sistemas, normas y que resumen el establecimiento de guías y orientaciones para desarrollar las rutinas o labores cotidianas, sin interferir en las capacidades intelectuales, ni en la autonomía propia e independencia mental o profesional (Álvarez, 1996).

1.1.2 Los principios generales de la Norma Iso/Iec 17025-2000 para el Funcionamiento de laboratorios:

Las organizaciones se registran bajo normas de sistemas de calidad ISO 9001 o 9002 en una amplia gama de sectores de igual manera los laboratorios se acreditan para pruebas o mediciones determinadas, para productos concretos y para especificaciones de prueba bajo el sistema de calidad ISO 17025.

Las razones principales por las cuales un laboratorio se acredita son:

- ✓ Identificar la competencia específica de los laboratorios.
- ✓ Establecer estándares mínimos de competencia.
- ✓ Mejorar el cumplimiento de Normas.
- ✓ Conocer los requerimientos regulatorios.
- ✓ Asegurar la aceptación de los datos del laboratorio.

La acreditación de un laboratorio es el reconocimiento formal de que un laboratorio es competente para cumplir pruebas específicas u otras definidas por diferentes entidades, la misma que es otorgada por un organismo de acreditación reconocido bajo criterios normados, después de la evaluación en sitio, del sistema de administración de calidad y de la aptitud específica por evaluadores calificados que se cercioraran de los requerimientos técnicos de cada método en particular, los procedimientos de calibración y la expresión de la incertidumbre de la medición (Álvarez, 1996).

1.1.3 Tipos de Manuales

Los manuales son textos utilizados como medio para coordinar, registrar datos e información en forma sistémica y organizada. También es el conjunto de orientaciones o instrucciones con el fin de guiar o mejorar la eficacia de las tareas a realizar.

Pueden distinguirse los manuales de:

Organización: este tipo de manual resume el manejo de una empresa en forma general. Indican la estructura, las funciones y roles que se cumplen en cada área.

Departamental: dichos manuales, en cierta forma, legislan el modo en que deben ser llevadas a cabo las actividades realizadas por el personal. Las normas están dirigidas al personal en forma diferencial según el departamento al que se pertenece y el rol que cumple (Bruce Silver, 2004).

Política: sin ser formalmente reglas en este manual se determinan y regulan la actuación y dirección de una empresa en particular.

Procedimientos: este manual determina cada uno de los pasos que deben realizarse para emprender alguna actividad de manera correcta.

Técnicas: estos manuales explican minuciosamente como deben realizarse tareas particulares, tal como lo indica su nombre, da cuenta de las técnicas.

Bienvenida: su función es introducir brevemente la historia de la empresa, desde su origen, hasta la actualidad. Incluyen sus objetivos y la visión particular de la empresa. Es costumbre adjuntar en estos manuales un duplicado del reglamento interno para poder acceder a los derechos y obligaciones en el ámbito laboral.

Puesto: determinan específicamente cuales son las características y responsabilidades a las que se acceden en un puesto preciso.

Múltiple: estos manuales están diseñados para exponer distintas cuestiones, como por ejemplo normas de la empresa, más bien generales o explicar la organización de la empresa, siempre expresándose en forma clara.

Finanzas: tiene como finalidad verificar la administración de todos los bienes que pertenecen a la empresa. Esta responsabilidad está a cargo del tesorero y el controlador.

Sistema: debe ser producido en el momento que se va desarrollando el sistema. Está conformado por otro grupo de manuales.

Calidad: es entendido como una clase de manual que presenta las políticas de la empresa en cuanto a la calidad del sistema. Puede estar ligado a las actividades en forma sectorial o total de la organización (Bruce Silver, 2004)

1.1.4 Pasos para Elaborar un Manual

Los pasos para hacer o elaborar un manual, de manera muy generalizada, para que los adaptes a tus necesidades particulares:

1. Definir el tema: debes acotar el alcance o profundidad del manual, en el fondo lo que vas a cubrir, para no extralimitarte o hacerlo demasiado breve
2. Relacionado con el punto 1, debes visualizar al lector objetivo al cual está dirigido el manual, para adaptar el lenguaje utilizado en el mismo y lo “técnico” de sus párrafos, a este lector o usuario (Villegas, 2006).
3. Define la estructura, en el fondo los temas a tratar, desde la introducción hasta los últimos consejos (es común una sección de FAQs o trouble-shooting como anexo). Directamente relacionado a esto se encuentra la necesidad de definir el medio de difusión: en las versiones impresas en general se permiten párrafos más extensos y detallados que en las guías o manuales en línea, donde deberás ser más conciso y al grano, para evitar esos largos scrolls para bajar la pantalla.
4. Toma manuales de temas similares, para tomar ideas y afinar la estructura, antes de comenzar.
5. Redacta el manual, tomando en cuenta todo lo anterior, y luego pásalo a diferentes personas que se ajusten a tu público objetivo, a ver si entienden bien el contenido, y tomas sus recomendaciones, para elaborar así una versión final (Villegas, 2006).

1.1.5 Contenidos de un Manual

Partes Componentes de un Manual

Los elementos que más interesan dentro de los integrantes de un manual son aquellos que serán objeto de consulta y que se encontrarán ubicados en lo que se denomina “cuerpo Principal” funciones, normas, instrucciones, procedimientos, lineamientos. Dependiendo estos temas del tipo de manual de que se trate.

En primer lugar comenzará el texto con una sección denominada “contenido”, donde se enunciarán las partes o secciones integrantes del manual. Esta sección será seguida de un “índice” en el que, al igual que todo texto, se indicará el número de página en que se localiza cada título y subtítulo.

Es un índice numérico, cuyo ordenamiento respeta la secuencia con que se presentan los temas en el manual (Cárdenas, 2001).

Pero también puede existir un índice temático, en el que los temas se presentan ordenados alfabéticamente para facilitar su localización por este medio. Por lo general, el índice temático se ubica como última sección del manual.

La tercera sección será la “introducción” en la que se explicará el propósito del manual y se incluirán aquellos comentarios que sirvan para proponer al lector y clarificar contenidos en los capítulos siguientes.

La cuarta sección contendrá la “instrucciones para el uso del manual”. Esto es, explicará de qué manera se logra ubicar un tema en el cuerpo principal a efectos de una consulta, o bien en qué forma se actualizarán las piezas del manual, dada la necesidad de revisiones y reemplazos de normas y medidas que pierden vigencia o surgen nuevas necesidades a cubrir.

La quinta sección es el “cuerpo principal”; es la parte más importante y la verdadera razón del manual (Cárdenas, 2001).

1.2 El manual como medio de comunicación

La tarea de elaborar manuales se considera como una función de mantener informado al personal clave de los deseos y cambios en las actitudes de la dirección superior, al delinear la estructura organizacional y poner las políticas y procedimientos en forma escrita y permanente (Villegas, 2006).

Un manual correctamente redactado puede ser un valioso instrumento y representa un medio de comunicación que tiene como propósito señalar en forma sistemática la información (Bruce Silver, 2004).

1.3 Objetivos de los manuales

De acuerdo con la clasificación y grado de detalle, los manuales permiten cumplir con los siguientes objetivos:

- a) Instruir a los usuarios, acerca de aspectos tales como: objetivos, funciones, procedimientos, normas.
- b) Precisar las funciones del Laboratorio para deslindar responsabilidades, evitar errores y detectar omisiones.
- c) Coadyuvar a la ejecución correcta de las labores a realizarse en el Laboratorio.
- d) Servir como medio de integración y orientación al usuario facilitando su incorporación a las distintas funciones operacionales.
- e) Permite conocer el funcionamiento interno por lo que respecta a descripción de tareas, ubicación y requerimientos.
- f) Auxilian en la inducción y al adiestramiento y capacitación de los usuarios ya que describen en forma detallada las actividades a desarrollar.
- g) Interviene en la consulta de todos los usuarios.
- h) Determina en forma más sencilla las responsabilidades por fallas o errores.

- i) Aumenta la eficiencia de los usuarios, indicándoles lo que deben hacer y cómo deben hacerlo.
- j) Construye una base para el análisis posterior del trabajo y el mejoramiento de los sistemas, procedimientos y métodos (Cárdenas, 2001).

1.4 Ventajas y desventajas de los manuales

Los manuales ofrecen una serie de posibilidades que nos reflejan la importancia de estos. Sin embargo, tienen ciertas limitaciones, lo cual de ninguna manera le restan importancia.

1.4.1 Ventajas

Un manual tiene, entre otras, las siguientes ventajas:

1. Logra y mantiene un sólido plan de organización
2. Sirve como una guía eficaz para la preparación y compensación del usuario.
3. Es una fuente permanente de información sobre el trabajo a ejecutar.
4. Evitan discusiones y mal entendidos, de las operaciones.
5. Aseguran continuidad y coherencia en los procedimientos y normas a través del tiempo.
6. Son instrumentos útiles en la capacitación de los usuarios.
7. Incrementan la coordinación en la realización del trabajo (Reyes, 1999).

1.4.2 Desventajas

Entre los inconvenientes que presentan los manuales se encuentran los siguientes:

1. Algunas entidades consideran que es demasiado caro, limitativo y laborioso preparar un manual.
2. Existe el temor de que pueda conducir a una estricta reglamentación y rigidez.
3. Su deficiente elaboración provoca serios inconvenientes en el desarrollo de las operaciones.
4. El costo de producción y actualización puede ser alto.
5. Si no se actualiza periódicamente, pierde efectividad.
6. Muy sintética carece de utilidad: muy detallada los convierte en complicados (Graham, 2006).

1.5 Guía para la elaboración del manual de procedimientos

La presentación de un procedimiento aislado, no permite conocer la operación de una dependencia, por lo que surge la necesidad de que todos los procedimientos se agrupen, en forma ordenada, en un solo documento, denominado “Manual de Procedimientos” (Ponce, 2001).

1.5.1 Concepto

El “Manual de Procedimientos” es, por tanto, un instrumento de apoyo que agrupa procedimientos precisos con un objetivo común, que describe en su secuencia lógica las distintas actividades de que se compone cada uno de los procedimientos que lo integran, señalando generalmente quien, como, donde, cuando y para que han de realizarse (Continolo, 2006).

1.5.2 Análisis y diseño de procedimientos

A través del conocimiento de los procedimientos puede tenerse una concepción clara y sistemática de las operaciones que se realizan en el Laboratorio; es importante que al

emprender un estudio de esta naturaleza, se aplique una metodología que garantice la descripción de los procedimientos, de acuerdo con la realidad operativa (Alvarez, 1996).

1.5.3 Delimitación del Procedimiento

Las siguientes preguntas se formulan con la finalidad de definir el tema a tratarse en el manual y las alternativas de estudio que el documento presente, satisfaciendo las necesidades del usuario.

¿Cuál es el procedimiento que se va a analizar?

¿Dónde se inicia?

¿Dónde termina?

Una vez contestadas las preguntas anteriores, se podrá fijar el objetivo del estudio; este servirá de guía para la investigación, el análisis y la propuesta del procedimiento o procedimientos en estudio (Reyes, 1999).

1.5.4 Recolección de la Información

Consiste en recabar los documentos y los datos, que a su vez organizados, analizados y sistematizados, permitan conocer los procesos tal y como operan en el momento, y posteriormente proponer los ajustes que se consideren convenientes (Ponce, 2001).

1.5.4.1 Las técnicas que usualmente se utilizan para recabar información necesaria

- a) Investigación documental
- b) Entrevista directa

c) Observación de campo (Ponce, 2001).

1.5.5 Análisis de la Información y Diseño del Procedimiento

Constituye una de las partes más importantes del estudio de procedimientos, consiste fundamentalmente en estudiar cada uno de los elementos de información o grupos de datos que se integrarán en el Manual durante la recolección de información, con el propósito de obtener un diagnóstico que refleje la realidad operativa dentro del Laboratorio.

La descripción de cualquier procedimiento deberá hacerse “a detalle”, sin obviar elementos que posteriormente pudieran repercutir en el análisis de la información e implique la realización de nuevas consultas para el desarrollo del Manual (Cárdenas, 2001).

1.6 Elementos que integran el manual de procedimientos

En la actualidad existe una gran variedad de modos de presentar un manual de procedimientos, y en cuanto a su contenido no existe uniformidad, ya que este varía según los objetivos y propósitos, así como su ámbito de aplicación.

Los elementos que se consideran, deben integrar un manual de procedimientos, por ser los más relevantes para los objetivos que se persiguen con su elaboración:

- Identificación
- Índice
- Introducción
- Objetivos del Manual
- Desarrollo de los procedimientos (Villegas, 2006).

1.6.1 Identificación

Se refiere a la primera página o portada del manual, en ella deberán aparecer los datos siguientes:

1. Logotipo de la dependencia
2. Nombre de la dependencia
3. Nombre o siglas de la unidad responsable de su elaboración
4. Título del Manual de Procedimientos
5. Fecha de Elaboración (Villegas, 2006).

1.6.2 Índice

En este apartado se presentan de manera sintética y ordenada, los apartados principales que constituyen el manual.

1.6.3 Introducción

Se refiere a la explicación que se dirige al lector sobre el panorama general del contenido del manual, de su utilidad y de los fines y propósitos que se pretenden cumplir. Es recomendable que, al formular la introducción, se emplee un vocabulario sencillo, a efecto de facilitar su entendimiento.

En síntesis la introducción deberá:

- Señalarse el objetivo del documento.
- Incluir información acerca del ámbito de aplicación del documento.

- Ser breve y de fácil entendimiento (Villegas, 2006).

1.6.4 Objetivos del Manual

El objetivo deberá contener una explicación del propósito que se pretende cumplir con el manual de procedimientos; su elaboración se ajustara a los lineamientos que se describen a continuación:

- Especificar con claridad la finalidad que pretende el documento.
- La redacción será clara, concreta y directa
- La descripción se iniciara con un verbo en infinitivo
- Se evitará el uso de adjetivos calificativos. Ejemplo: bueno, excelente (Ponce, 2001).

1.6.5 Desarrollo de los Procedimientos

Constituye la parte central o sustancial del Manual de Procedimientos, se integra por los siguientes apartados:

- El nombre del procedimiento debe dar idea clara de su contenido.
- La descripción del procedimiento debe redactarse en forma clara y sencilla.
- No se deben incluir dos procedimientos diferentes en uno (Álvarez, 1996).

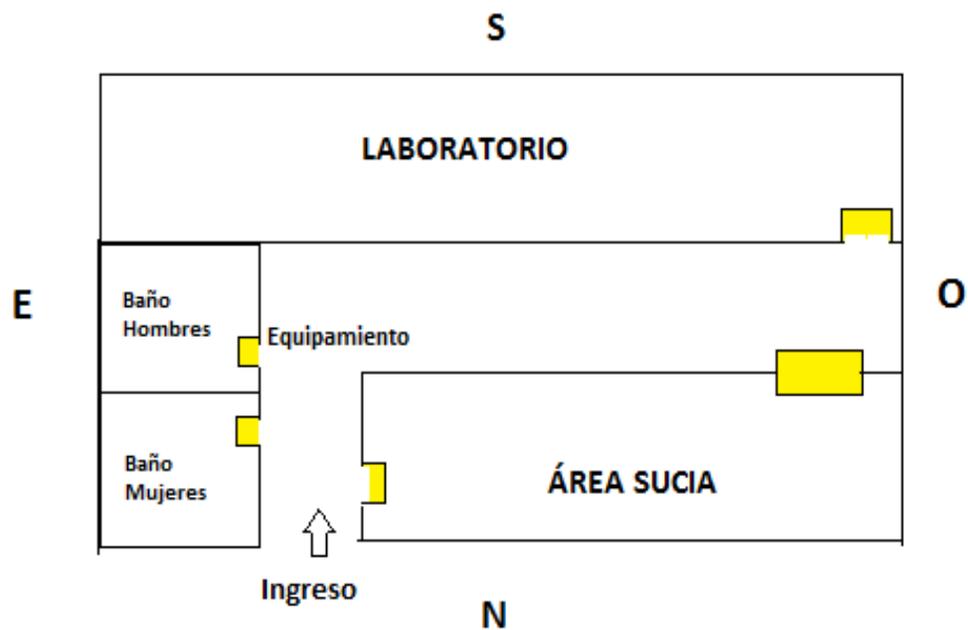
CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se refiere a la ubicación geográfica del laboratorio en donde se realizó el estudio, los materiales utilizados y la metodología.

2.1 Características del área (Laboratorio)

Figura 1: Ubicación de la Investigación



Fuente: Directa

Elaborado por: Ivonne Villacis

2.1.1 Ubicación Política y Geográfica

- Provincia : Cotopaxi

- Cantón: Latacunga
- Parroquia: Eloy Alfaro
- Barrio: Salache Bajo

2.1.2 Coordenadas Geográficas

- Latitud: 00°59'47.68"S
- Longitud: 78°31'19.16"W.
- Altitud: 2757.591 m.s.n.m

2.1.3 Datos Meteorológicos

- Temperatura promedio: 10.7°C
- Pluviosidad: 175 mm (anuales)
- Horas luz/día: 12 horas
- Viento: Sureste-Noreste
- Nubosidad anual: 4.7/8.

Fuente: (Registros administración CEYPSA 2005)

2.2 Materiales

Para el desarrollo del Manual se utilizo los materiales que a continuación se detallan.

2.2.1 Recursos Humanos

- a. Tesista
- b. Transporte

- c. Alimentación

2.2.2 Materiales de Oficina

- a. Computadora
- b. Memoria USB
- c. Libreta de apuntes
- d. Perforadora
- e. Grapadora
- f. Internet
- g. Papelería y materiales
- h. Bolígrafos
- i. Resma de hojas

2.3 Diseño Metodológico

2.3.1 Tipo de Investigación

2.3.1.1 Investigación Descriptiva

El objetivo de la investigación descriptiva consiste en llegar a conocer las situaciones, costumbres y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades, objetos, procesos y personas. Su meta no se limita a la recolección de datos, sino a la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables (Cárdenas, 2001).

En el presente estudio de investigación se logró recopilar información misma que ayudó para la elaboración del MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN.

2.3.1.2 Investigación Exploratoria

Es aquella que se efectúa sobre un tema u objeto desconocido o poco estudiado, por lo que sus resultados constituyen una visión aproximada de dicho objeto, es decir, un nivel superficial de conocimiento.

Dirigidos a la formulación más precisa de un problema de investigación , dado que se carece de información suficiente y de conocimiento previos del objeto de estudio , resulta lógico que la formulación inicial del problema sea imprecisa.

La presente investigación ayudo a adquirir conocimientos y a obtener información de la existencia de los equipos de laboratorio y el manejo de los mismos para realizar prácticas acorde al manual utilizado y al tema de estudio en este caso la crioconservación de semen (Villegas, 2006).

2.4 Métodos y Técnicas

El método utilizado fue el deductivo, inductivo, analítico y el método no experimental.

2.4.1 Método Deductivo

En la presente investigación se utilizó este método para establecer una observación detallada de cada uno de los procesos con el fin de lograr resultados.

2.4.2 Método Inductivo

El método se inicia con un estudio individual de los hechos y se formulan conclusiones universales que se postulan como leyes, principios o fundamentos de una teoría.

2.4.3 Método Analítico

Este método es un proceso cognoscitivo, que consiste en descomponer un objeto de estudio separando cada una de las partes del todo para estudiarla de forma individual.

2.4.4 Método No Experimental

Se entiende por investigación no experimental cuando se realiza un estudio sin manipular deliberadamente las variables. La investigación no experimental es la búsqueda empírica y sistemática en la que el científico no posee control directo de las variables independientes, debido a que sus manifestaciones ya han ocurrido o ha que son inherentemente no manipulables, en el método no experimental el investigador se limita a seleccionar los sujetos que ya poseen esos valores de la variable independiente.

2.5 Técnicas

2.5.1 Fichaje

El fichaje es una técnica auxiliar de todas las demás técnicas empleada en investigación científica; consiste en registrar los datos que se van obteniendo en los instrumentos llamados fichas, las cuales, debidamente elaboradas y ordenadas contienen la mayor parte de la información que se recopila en una investigación por lo cual constituye un valioso auxiliar en esa tarea, al ahorrar mucho tiempo, espacio y dinero. En esta investigación se aplicara en fichas técnicas información de los equipos del laboratorio.

2.6 Metodología

En esta metodología se realizó la revisión bibliográfica y recopilación de información la misma que será útil para realizar los manuales, se puede definir como la descripción, y la valoración crítica de los métodos de investigación.

La metodología es el instrumento que enlaza el sujeto con el objeto de la investigación, sin la metodología es casi imposible llegar a la lógica que conduce al conocimiento científico.

2.7 Diseño de la Investigación

2.6.1 Preguntas Directrices

¿Cómo ayudará el MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE MAMÍFEROS DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN en el aprendizaje de los estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria?

Es una herramienta que constituye una guía para los estudiantes, puesto que se detalla información precisa, es un documento interno el cual consta de políticas y procedimientos para el desarrollo correcto de las prácticas a realizarse en el laboratorio.

¿Cómo beneficiará al ofrecer información mediante el manual de crioconservación de semen para el desarrollo de las prácticas didácticas por los estudiantes de la Carrera de Medicina Veterinaria?

Este documento es un medio de información que facilitará a los alumnos de las experiencias educativas y conocimientos en: reproducción animal y técnicas de la reproducción, utilizando la habilidad y destreza de cómo llevar a cabo cada uno de los protocolos de crioconservación de semen y así lograr la eficiencia y eficacia en las prácticas mediante el logro de los objetivos planteados.

¿Permitirá ayudar mediante los manuales a realizar las prácticas con los estudiantes de la carrera de Medicina Veterinaria?

El manual complementará los conocimientos adquiridos por los estudiantes y fortalecerá cada una de las actividades a realizarse dentro del laboratorio tanto en la operabilidad como en la organización de cada práctica, estimulando a los alumnos a establecer las medidas necesarias para el desarrollo óptimo y la obtención de los resultados deseados.

MANUAL

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**MANUAL DE CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE
MAMÍFEROS DOMÉSTICOS EN EL LABORATORIO DE
BIOTECNOLOGÍA DE REPRODUCCIÓN DE LA UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE COTOPAXI 2013.**

ELABORADO POR: Ivonne Alexandra Villacis Mora

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Cristian Arcos

DIRECTORIO INSTITUCIONAL

RECTOR

ING. MSC. HERNÁN YÁNEZ ÁVILA

DIRECTOR ACADÉMICO UA-CAREN

DR. MSC. ENRIQUE ESTUPIÑÁN

DIRECTOR DE TESIS

DR. CRISTIAN ARCOS

INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso complejo para dar origen un nuevo ser. La capacidad de producir nuevos individuos es una de las características fundamentales de los organismos vivos. Todas las especies de animales pluricelulares tienen un período de vida limitado, y la supervivencia requiere de un mecanismo que permita la producción de nuevas generaciones de la misma especie, es decir, la capacidad de reproducción.

El propósito de este manual es la de conocer y de aplicar los principios de la reproducción en la planeación, organización, evaluación, control y supervisión de ésta, considerándola como un evento de suma importancia en el proceso productivo de las especies de fin zootécnico. Igualmente se procura adquirir un lenguaje propio de la reproducción animal, como también la adquisición de los conocimientos esenciales, procurando en lo posible el fortalecimiento del estudiante en su formación como Médicos Veterinarios, capaces de adquirir conocimientos y habilidades en relación con la producción, manejo y utilización de las diversas técnicas de reproducción, como soporte al perfecto conocimiento de los procesos fisiológicos, reproductivos tanto en la hembra como en el macho de los animales domésticos.

El objetivo de este manual obedece a un proceso de actualización y fundamentación para la formación de estudiantes en el campo de la reproducción, buscando con esto las experiencias y vivencias de los educandos para que a través del debate se construya el conocimiento que sustenta los marcos conceptuales mediante la aplicación de prácticas del saber en esta área del conocimiento, interpretando y analizando los procesos funcionales de la reproducción y su regulación en diferentes especies domésticas.

La utilización dada a este Manual, logrará que el estudiante desarrolle un rol activo en todo el proceso de aprendizaje-enseñanza.

ANTECEDENTES

La congelación de espermatozoides se inicia de forma experimental con previsión de utilizarla en inseminación artificial (IA) en el año 1949. En esta fecha Polge y colaboradores, descubrieron el efecto positivo del glicerol como crioprotector añadido a los medios de congelación. El vacuno fue la especie donde se consiguieron mejores resultados, la resistencia al frío de sus espermatozoides permitió obtener partos en vacas inseminadas artificialmente con semen descongelado (IAC). La técnica se difundió con facilidad por la mejora en la descendencia de producción de leche y carne, en el resto de las especies no se tuvo esta expansión, y los modelos de congelación eran copiados de los utilizados en vacuno.

En porcino los espermatozoides son especialmente sensibles al frío, cuando se someten a temperaturas por debajo de 15°C, se inician daños en membrana plasmática y acrosómica que determinan alteraciones posteriores de la célula; con temperaturas de congelación los daños son mayores y además de las membranas se deteriora el citoesqueleto, se dañan el ADN, incrementa la oxidación celular y se producen pérdidas de enzimas; todas estas alteraciones provocan daños irreversibles en la viabilidad y funcionalidad de la célula espermática. En las primeras congelaciones realizadas en porcino en las décadas 50 y 60, la calidad seminal post-descongelación era muy mala, y no se consiguieron partos en cerdas inseminadas.

En 1970 otra vez Polge y colaboradores, obtuvieron la primera camada de lechones depositando semen descongelado en oviducto previa intervención quirúrgica. Un año después tres equipos distintos consiguen fertilidad en cerdas con IAC (Graham, 1971); (Pursel y Johnson, 1971); (Crabo y Einarsson, 1971).

En España Vicente Sarmiento de la Estación Pecuaria de Murcia, presentó en 1972 en el Congreso Mundial de deIA y Reproducción Animal de Munich, el primer trabajo con resultados de fertilidad utilizando semen de verraco congelado en pajuelas. En 1975 se publican dos metodologías de congelación de semen de verraco que han sido

la base de las utilizadas hasta el día de hoy: en EEUU Pursel y Johnson, 1975 que congelan en píldoras, y en Alemania Westendorf, 1975 en pajuelas de 5 ml. Aunque se mejoró notablemente la calidad del semen post-descongelación, los resultados conseguidos en fertilidad y tamaño de camada se alejaban a los obtenidos en monta natural, por lo que no logró expandirse de forma rutinaria como había hecho en vacuno.

3 PREPARACION DE UN LABORATORIO PARA REPRODUCCIÓN.

3.1 Normas de trabajo para un laboratorio de reproducción.

3.1.1 Hábitos Personales

- Mantener en todo momento las batas y vestidos abrochados
- No abandonar objetos personales en mesas de trabajo
- No comer ni beber en laboratorios
- No fumar en los laboratorios
- Es recomendable usar gafas de seguridad cuando se manipulen productos químicos o líquidos en ebullición.
- No utilizar lentes de contacto en el laboratorio
- Lavarse las manos antes de abandonar el laboratorio, al quitarse los guantes protectores y siempre que se haya estado en contacto con material irritante, cáustico, tóxico o infeccioso.

3.1.2 Lavado Quirúrgico de Manos e Indumentaria

Es la remoción química de microorganismos que destruyen o matan la flora transitoria y remueve las residentes presentes en la piel.

1. Debe quitar todas las prendas de las manos y muñecas
2. Se debe mantener la higiene de las uñas (cortas y sin pintar)
3. No usar debajo de la indumentaria quirúrgica ropa de calle

Materiales:

- Solución de povidona yodada al 10%, solución de clorhexidina al 4% u otra.
- Cepillo de uñas esterilizado.
- Toalla o compresas estériles.
- Lima para limpiarse las uñas.

- Guantes de látex, estériles y descartables.
- Mascarilla desechable.

Procedimiento:

- a) Humedecer las manos con abundante agua en un lapso de 2 a 3 segundos
- b) Colocar jabón meticulosamente en manos e interdigitalmente
- c) Lavar palmas y dorso de las manos, cepillar las uñas
- d) Lavar antebrazos en forma circular de distal a proximal hasta 2.5 cm por encima del codo, evitar volver a las áreas ya lavadas
- e) Enjuagarse con abundante agua de la porción distal a la proximal
- f) Secar primero las manos y luego antebrazos con toalla estéril

3.1.3 Uso de guantes estériles

Previo lavado quirúrgico de manos, abrir el paquete de guantes (o un ayudante presentar los guantes). Tomar el primer guante por su cara interna, es decir, por la cara que estará en contacto directo con su piel e introducirlo. Tomar el segundo guante con la mano enjuagada, tomándolo por su cara externa e introducirlo.

3.1.4 Uso de Mascarillas

- ✓ Previo lavado de manos, colocar la mascarilla cubriendo nariz y boca, luego amarrarla tomando solamente las tiras.
- ✓ Moldear a la altura de la nariz para dejarla cómoda y segura.
- ✓ Lavar las manos.

3.2 Buenas prácticas de laboratorio

Por sus propias características, el trabajo en el laboratorio presenta una serie de riesgos de origen y consecuencias muy variadas, relacionados básicamente con las

instalaciones, los productos que se manipulan (y también con las energías y organismos vivos) y las operaciones que se realizan con ellos. En consecuencia, la prevención de los riesgos en el laboratorio presenta unas características propias que la diferencian de otras áreas productivas.

3.2.1 Organización del trabajo en el Laboratorio

La organización del laboratorio debe permitir la correcta gestión de la prevención. Partiendo del propio compromiso de la dirección, el laboratorio debe estar adecuadamente jerarquizado para que la aplicación del principio de la seguridad se pueda establecer sin problemas.

Si se cuenta con las adecuadas instalaciones, las técnicas de trabajo estudiado e implantado (tanto en orden a la calidad del trabajo, como a la seguridad) y el personal tiene una formación suficiente, en un buen número de actividades los riesgos se eludirían.

Esta situación conduce necesariamente a una atención especial por parte de los usuarios del laboratorio, que podrían concretarse en una serie de precauciones que deben mantenerse permanentemente durante el trabajo. Estas precauciones pueden concretarse específicamente para cada laboratorio en función de su actividad, considerando minuciosamente los posibles incidentes que pueden ocurrir en el desarrollo de las diferentes técnicas.

3.3 Características de los equipos

- a) Vagina Artificial
- b) Electroeyaculador
- c) Microscopio de Contraste de Fases
- d) Cámara de Newbauer
- e) Eosina- Nigrosina

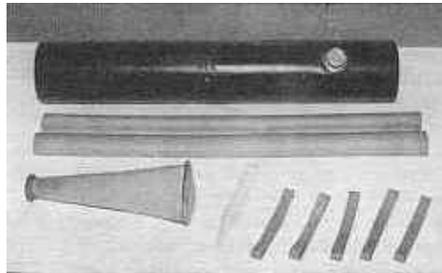
- f) Estereomicroscopio
- g) Cryologic 5500
- h) Material para el llenado de pajillas
- i) Tanque de Nitrógeno Líquido

A. Vagina Artificial

La vagina artificial se compone de las siguientes partes:

- Cuerpo rígido de la vagina con válvula
- Manguito interno de látex
- Cono de látex
- Vaso recolector de semen
- Cubierta de protección térmica

Figura 2: Partes de la Vagina Artificial



Fuente: Urdaneta, 2006

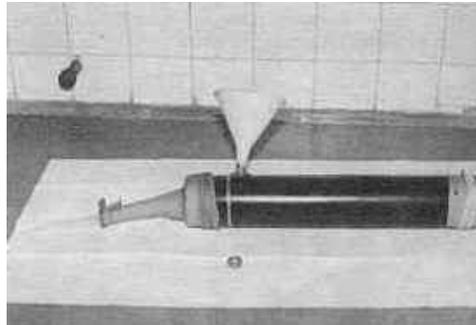
Antes del uso de la vagina artificial, el manguito interno y el cono deben estar esterilizados y secos.

La Vagina se arma de la siguiente forma:

Pase el manguito interno a través del cuerpo de la vagina y arremangue ambos extremos del manguito sobre los bordes del cuerpo. Asegure los extremos arremangados mediante anillos de goma. Coloque luego el cono de goma sobre uno de los extremos

del cuerpo, para que el semen pueda escurrir fácilmente al vaso colector de semen fijado al extremo delgado del cono. Fije la cubierta de protección térmica sobre el cono con el vaso. Llene la vagina con agua caliente a más 45°C y aplique luego algo de lubricante sobre la superficie del manguito interno.

Figura 3: Proceso de llenado de la Vagina Artificial



Fuente: Moreno, 2008

El agua tiene la finalidad de calentar las partes internas del manguito. Para el momento de la colección, el interior de la vagina debiera alcanzar a más 38°C hasta más 42°C. La temperatura interior puede medirse introduciendo un termómetro a través de la abertura anterior de la vagina.

Limpieza y Esterilización:

Después del uso, las partes constituyentes de la vagina deben lavarse bien con agua jabonosa y arrastrarse completamente los restos de lubricante. A continuación debe enjuagarse todo con agua pura.

Evite que queden restos de detergente o desinfectante en el manguito o en el cono.

Después del lavado, el manguito interno y el cono deben hervirse por 10 minutos en agua destilada, dejando secar a continuación. En forma alternativa se recomienda la utilización de un esterilizador a vapor “Sterivar”, en el cual se pueden esterilizar cómodamente las vaginas completas. Sin embargo, los conos debieran ser desprendidos

para su limpieza y esterilización separada, pues de otro modo tienden a mantenerse humedad y residuos entre manguito y cono.

Consideraciones:

- Los productos de Látex tienen una vida útil de 4 a 5 años.
- Látex no debe almacenarse en ambientes mojados o húmedos
- No deben utilizarse sustancias con contenido graso para la protección de productos de Látex, como ser parafina líquida, vaselina u otros aceites.
- Es especialmente importante dejar secar completamente después de la limpieza las paredes internas de los manguitos y conos, para mantenerlos en buen estado.

B. Electroeyaculador

La electroeyaculación consiste en extraer semen a los animales sin previo acostumbramiento. Esto es de suma importancia para la evaluación de reproductores a campo, donde la colección de semen se puede realizar en la manga en el mismo momento del examen clínico. Además, es muy utilizada cuando se trabaja con animales no domésticos, sino de vida silvestre o de zoológicos.

Fue utilizada primeramente por Gunn (1936) en Australia. Está basada en la aplicación rítmica de un estímulo eléctrico por vía transrectal estimulando el sistema nervioso autónomo y somático, que conduce a la obtención de secreciones de las glándulas accesorias y finalmente a la eyaculación.

La unidad completa consiste en lo siguiente:

- Máquina generadora de pulsos
- Batería recargable
- Sonda de 2 ¾ de diámetro

- Cargador para la batería 110 volts ac
- Sonda de mano
- 2 cables para la sonda
- Cono y porta cono recolector
- Estuche para traslado

El uso de la electroeyaculación está indicado en las siguientes situaciones:

- a) Eyaculado para diagnóstico (espermiograma, cultivo bacteriológico, reacciones inmunológicas, piospermia)
- b) Procesamiento de semen para inseminación artificial
- c) Inspección clínica del pene por producir protrusión del mismo
- d) Animales indóciles o de baja libido
- e) Animales con algún tipo de impotencia pero fértiles (por ejemplo enfermedades en los miembros o columna que les impidan la monta natural)

Metodología

- El electrodo debe tratar de colocarse sobre la Ampolla de Henle y las glándulas vesiculares, para inducir la emisión de semen de los conductos deferentes.
- El electrodo se debe ajustar contra el ano y se debe mover para adelante y hacia atrás, haciendo ligera presión hacia abajo. Así se pretende aplicar el estímulo eléctrico sobre los nervios que promueven la erección y la eyaculación, que se encuentran caudalmente, e igualmente se trata de evitar los nervios motores (como el ciático y el obturador).

C. Microscopio de Contraste de Fases

El microscopio de contraste de fase permite observar células sin colorear y resulta especialmente útil para células vivas.

Este aprovecha las pequeñas diferencias de los índices de refracción en las distintas partes de una muestra de tejido.

La luz que pasa por regiones de mayor índice de refracción experimenta una deflexión y queda fuera de fase con respecto al haz principal de ondas de luz que pasaron la muestra. Aparea otras longitudes de onda fuera de fase por medio de una serie de anillos ópticos del objetivo y del condensador, anula la amplitud de la porción fuera de fase inicial del haz de luz y produce un contraste útil sobre la imagen. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las porciones densas del espécimen; las partes claras de la imagen corresponden a porciones menos densas. Por lo tanto estos microscopios se utilizan para observar células vivas, tejidos vivos y cortes semifinos no coloreados.

Figura 4: Microscopio de Contraste de Fases



Fuente: Gundlach, 2003

Funcionamiento

Por medio del condensador, se logran separar los rayos luminosos que no son difractados por el objeto de los que no lo hacen, al pasar por la muestra, los rayos que atraviesan objetos más densos, experimentan un retraso de un cuarto de λ , y al

pasar por el anillo de fase estos rayos, debido a la forma del anillo de fase, estas ondas se retrasan un cuarto de λ más, en cambio, las que no se han retrasado, pasan por una parte más delgada del anillo de fase y no se siguen retrasando. Entonces estos desfases de las ondas luminosas se perciben como diferencias en el contraste, en distintos tonos de gris. Además el anillo de fase disminuye la intensidad de la luz.

Figura 5: Partes del Microscopio de Contraste de Fases



Fuente: Langerón, 2005

D. Cámara de Newbauer

Es un instrumento utilizado para realizar el recuento de células en un medio líquido. Esta cámara de conteo está adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas y que en el fondo de las cuales se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas.

Procedimiento

- Se cubre la cámara con un cubre-cámaras que se adhiere por simple tensión superficial.

- Luego se introduce el líquido a contar, al que generalmente se ha sometido a una dilución previa con un diluyente, por capilaridad entre la cámara y el cubrecámara; puesto que tiene dos zonas esto permite hacer dos recuentos simultáneamente.
- Para contar las células se observa el retículo al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células.
- Con base en la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo del retículo, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la muestra líquida inicial.
- La fórmula de valoración del número de células (válida universalmente) es la siguiente: $\text{Partículas por } \mu\text{l} = \frac{\text{partículas contadas}}{(\text{superficie contada (mm}^2) \cdot \text{profundidad de la cámara (mm) \cdot Dilución})}$

En el retículo central, la cámara de Neubauer posee un cuadrado primario que contiene nueve cuadrados secundarios cada uno de ellos divididos a su vez en 16 cuadrados terciarios, el cuadrado central contiene 25 cuadrados, cada uno de ellos dividido a su vez en 16 cuadrados cuaternarios. En los secundarios de los bordes superiores e inferiores de la cámara se hace el recuento.

E. Tinción con Eosina-Nigrosina

Dado que los espermatozoides inmóviles pueden estar vivos, solo una coloración supravital de eosina-nigrosina puede establecer esa diferencia.

Coloración Supravital

Los espermatozoides muertos o en proceso de muerte, poseen sus membranas permeables a los colorantes. Por tal razón se emplea esta propiedad para la determinación de los espermatozoides vivos.

Existen varios métodos de coloración, de los cuales se ejemplificará uno simple

Preparación de la Solución Colorante

- 0,2 g de Eosina
- 0,3 g de Citrato de Sodio dihidratado
- 10,0 ml de Agua Destilada

Si la coloración con eosina se hace sin nigrosina deberá emplearse un filtro azul o un microscopio con contraste de fase.

Esta coloración puede ser reemplazada por los exámenes de motilidad rectilínea progresiva y morfología espermática. Su uso está indicado particularmente en caso de inexperiencia en las evaluaciones mencionadas. El semen con más de 30% de muertos no es congelable.

Metodología de Coloración

- ✓ Los frotis deben mantenerse en un lugar seco. La humedad deteriora las pruebas.
- ✓ Los colorantes deben mantenerse durante su uso a 30°C (platina térmica o estufa) para evitar el shock térmico y de esta forma datos falsos.
- ✓ Luego de extraído el semen y después de observar la motilidad en masa, se toma una gota, y se la coloca sobre portaobjetos.
- ✓ Se agrega una gota del colorante de eosina, se homogeniza la mezcla con un cubreobjetos, varilla o escarba dientes y luego se agrega una gota de nigrosina.
- ✓ Luego de 1 minuto se realiza el frotis.
- ✓ Se observa, al cabo de 2 min, sin cubreobjetos con aumento 40x o con inmersión 100x.

Recuento de células vivas y muertas

- Con microscopio óptico, recorrer el frotis en forma de guarda griega y contar 200 células distribuidas en el preparado.

- Estimar el porcentaje de vivos (o muertos), a partir de las 200 células contadas. Si la solución resultara demasiado diluida, repetir la operación aumentando el número de filas.
- Con una muestra de semen descongelado, se podrá esperar 60 a 80% de células vivas: Correlacionar con el porcentaje de móviles al descongelar. Si el semen tiene menos de 40% de movilidad rectilínea progresiva totales y menos de 40% de vivas-cifras equivalentes, el semen no es recomendable para ser usado en inseminación artificial.
- Luego de 1-2 min se observan espermatozoides rojos y no coloreados, sobre el fondo oscuro. La diferencia de coloración se debe a que los espermatozoides vivos como tienen su membrana plasmática intacta, no se colorean. El colorante puede penetrar, sin embargo, la membrana de los espermatozoides muertos y los colorea.

F. Estéreo microscopio

El estéreo microscopio, o también conocido como lupa binocular, es un instrumento óptico que produce una imagen aumentada del objeto que se observa a través de ella. La lupa binocular forma una imagen de un tamaño aproximado de entre 20 y 40 veces mayor que el objeto que estamos observando. Este instrumento permite visualizar muestras opacas, tridimensionales y sin ningún tipo de preparación (minerales, pequeños insectos, objetos pequeños).

Procedimiento

1. Coloca sobre la platina el objeto que vayas a observar. Desplaza el cuerpo de la lupa por la columna hasta que los objetivos estén a unos 6 cm del objeto, para esto debes utilizar el mando de bloqueo.

2. Usando el mando, enfoca solamente con el ojo derecho. Fija tu atención en un punto concreto del objeto.
3. Cierra el ojo izquierdo y abre el derecho. Fíjate en el mismo punto del objeto que en el apartado anterior y si no lo ves nítido, mueve el anillo corrector de la visión hasta obtener una imagen nítida.
4. Mirando con los dos ojos a la vez, gira los cuerpos de los oculares hasta que se forme una imagen en relieve dentro de un solo círculo. Con esta operación la distancia entre los dos oculares es igual a tu distancia interpupilar.
5. Con el mando de enfoque puedes desplazar los sistemas ópticos y así observar los diferentes planos del objeto.
6. Observa diferentes objetos con volúmenes distintos para que te adiestres en el manejo de este instrumento.

Aplicaciones

Los estéreos microscopios son usados para imágenes tridimensionales donde la percepción de la profundidad y contraste es crítica para la interpretación de la estructura del espécimen. El amplio campo de observación y el aumento variable de los estéreos microscopios los hace apropiados para aplicaciones tanto en ensambles industriales como en investigación biológica para la manipulación de organismos vivos sensibles y delicados.

G. Cryologic 5500

Cryologic es una compañía australiana enfocada en diseñar, desarrollar y manufacturar instrumentos que combinan alto rendimiento, alta calidad y destacada confiabilidad combinados con sencillez.

Cryologic tiene una política de continuar desarrollando y actualizando sus productos para asegurar que estos mantengan excelente tecnología, prácticos para el uso y apropiados en un mundo cambiante en ciencia y tecnología.

La compañía fue establecida en 1985 y en la actualidad es una de las líderes en manufactura de sistemas de Criopreservación con redes de distribución en más de 80 países. El éxito de Cryologic proviene de una mente innovadora, un compromiso con la calidad y la excelencia y con el servicio al cliente.

Los sistemas del CONTROLADOR DE CONGELAMIENTO poseen una velocidad controlada, los congeladores a base de nitrógeno están diseñados precisamente para la Criopreservación de especímenes biológicos. El sistema del CONTROLADOR DE CONGELAMIENTO provee un método patentado y confiable para la regulación de temperatura y transferencia de calor durante el congelamiento de material biológico para largos períodos de preservación y una recuperación viable.

Los usuarios seleccionan del rango de temperaturas controladas y de la crio cámara para configurar al sistema de forma que puedan obtener sus específicos requerimientos.

Los sistemas del Controlador de Congelamiento poseen un diseño modular y sus partes son intercambiables.

- ✓ Cada sistema consiste en un Controlador de Temperatura, una Crio Cámara y una Crio Tina.
- ✓ La Crio Cámara permanece en contacto directo con el nitrógeno líquido en la Crio Tina.
- ✓ La Crio Cámara está conectada con el Controlador de Temperatura, el cual regula la temperatura de especímenes biológicos.
- ✓ Ninguna instalación especial es requerida: los sistemas pueden ser configurados rápidamente y empaquetados por el usuario.

Precisión

- ✓ Su único diseño, permite que la temperatura sea más precisa y verazmente mantenida en términos económicos.
- ✓ Menos consumo de nitrógeno líquido y energía.
- ✓ Mínimos requerimientos de mantenimiento. Así que lo mínimo mantiene el costo.

Seguro y Silencioso

- ✓ No posee componentes magnéticos, ventiladores o válvulas con partes móviles

Opciones de energía

- ✓ Fuente de poder universal.
- ✓ El sistema puede también ser usado para un determinado paquete de energía.

Fácil de usar

- ✓ Simple de operar.
- ✓ Posee una interfase para el usuario para controlar todas las temperaturas.

Portátil

- ✓ Compacto y de liviano peso, fáciles de mover de un lugar a otro y fácil de transportar.

Protocolos de temperatura

- ✓ Los protocolos de temperatura pueden ser pre-instalados en una tarjeta de memoria interna.
- ✓ Los protocolos de temperatura pueden ser también desarrollados usando el programa de CryoGenesis.

- ✓ Los protocolos incluyen un rango de temperatura, frecuencia y duración. El programa final puede ser manejado manualmente o automático.

H. Material para el Llenado de Pajillas

Impresión

El semen se empaqueta en pajillas de 0.5 y 0.25 mililitros con tapones rojos, blancos y azules. Cada pajilla tiene el logotipo, el nombre completo registrado del animal, el país de registro y el número de registro, el código del animal, y el número de recolección impresos en ellas. El software de impresión de la pajilla asegura la información precisa y legible que es consistente con lo impreso en cada pajilla. Además, las etiquetas con código de barras se imprimen para verificar la identidad de cada grupo de pajillas.

Empaque

Se usan máquinas automáticas de llenado/sellado para empaquetar el semen en las pajillas. Se observa el sistema de revisiones y balanzas para asegurarse de que las pajillas adecuadas sean llenadas con el semen del animal correcto. Las pajillas son llenadas con el semen a presión y son selladas con ultrasonido para completar el proceso.

I. Tanque de Nitrógeno Líquido

El termo es de diferentes capacidades que conserva el frío producido por el nitrógeno líquido que contiene. En el interior del termo se guardan las ampollas y pajillas donde están los espermatozoides, éstos se conservan vivos allí por muchos años. El nitrógeno es un gas inerte, incoloro, insípido e inodoro, es decir que es inactivo, transparente y que no sabe ni huele a nada. En estado líquido es uno de los productos más fríos, pues

su temperatura es de 196°C bajo 0. Al manejar el termo con nitrógeno se debe tener las siguientes precauciones:

- ✓ Conservar el termo en lugares ventilados
- ✓ Mantener el tapón del termo limpio y seco, para evitar la formación de escarcha que impide la salida de vapores.
- ✓ Al transportar un termo dejar abiertas las ventanas del carro.
- ✓ Al destapar el termo evitar que los vapores nos lleguen a la cara.

Figura 6: Tanque de nitrógeno líquido



Fuente: Martínez, 2008

Manejo del Nitrógeno

Utilizar guantes y anteojos para manipular nitrógeno, evitar todo contacto con la piel pues ocasiona quemaduras. El nitrógeno no debe estar por debajo de (10) centímetros, desde el fondo; para medirlo se introduce una varilla dentro del termo, y la dejamos por unos 5 o 10 segundos. La zona de la varilla cubierta de escarcha indica el contenido de nitrógeno en el termo. Reponer el nitrógeno faltante en el termo.

El principio es como el de cualquier otro termo, un botellón dentro de otro botellón y un compartimiento termoaislante entre los dos. En este caso son dos tanques metálicos que albergan nitrógeno, poseen un sistema muy eficiente logrado a base alto vacío, ya que todo el aire entre los dos tanques ha sido extraído mediante una válvula que se encuentra en la superficie del tanque exterior.

El tanque interior es de acero, está revestido con varias capas de aluminio y un papel especial, que permite un mayor aislamiento con respecto al tanque exterior, lo que permite que su parte interna siempre tenga una temperatura de -196°C .

PRÁCTICAS

3.4 PRÁCTICA N° 01 COLECCIÓN DE SEMEN

Introducción

La realización de esta práctica se lleva a cabo en búsqueda de adquirir destreza en el armado, montaje y uso de equipos y materiales necesarios para llevar a cabo la colecta de líquido seminal por medio de las diversas técnicas. Es importante tener especial cuidado en el control de la temperatura del semen colectado, para evitar choques térmicos.

Las condiciones de trabajo para coleccionar semen, el estado de salud del animal y la experiencia del personal especializado que opera, son factores que deben tomarse en cuenta para mejorar la calidad del semen.

El intervalo de colección de semen es de importancia debido a que una alta frecuencia puede afectar la concentración espermática y la madurez de los espermatozoides; por el contrario una baja frecuencia de colección puede afectar la motilidad espermática y su vitalidad.

Objetivos

- ✓ Adquirir destreza en el armado y uso de todos los materiales y equipos necesarios para la colecta y evaluación del semen.
- ✓ Llevar a cabo los protocolos necesarios para el desarrollo de la práctica.
- ✓ Determinar el momento exacto de la colecta para evitar la contaminación del semen con presencia de orina u otros materiales ajenos.

3.4.1 Colección de semen en bovinos

3.4.1.1 Vagina Artificial

3.4.1.1.1 Materiales:

- Toro
- Vagina Artificial
- Agua caliente
- Toallas absorbentes
- Guantes
- Maniquí (vaca o toro)
- Tubo de Recolección (tubo de centrífuga graduado de cristal o de plástico)
- Gel lubricante

3.4.1.1.2 Metodología:

1. Inmovilizar a la vaca o toro, en el cual el semental realizará la monta para la recolección de semen por la vagina artificial.
2. Lubricar de 10 a 15 cm de la entrada de la VA.
3. Llenar el espacio entre el tubo de plástico y el de látex con agua entre 42 y 45°C.

4. Agregar aire a través de la válvula de agua para proporcionar la presión adecuada.
5. Colocar la camisa aislante que cubre el tubo o cono donde se recibirá el eyaculado para evitar el shock térmico.
6. Pasar al toro delante de otros toros o encerrándolo cerca de otros machos. Esto incrementara el volumen y la concentración espermática.
7. Dejar dos o tres montas falsas antes de la monta firme.
8. Cuando el macho monta a la hembra, se introduce la vagina artificial en el pene desviado, lo cual se logra sujetando el pene del prepucio con la mano libre de la persona que va a colectar el semen.
9. Se debe observar los movimientos del macho y cuando éste lleve a cabo el empuje de la cadera hacia delante el macho ha eyaculado y se procede a realizar la evaluación del mismo.

Figura 7: Recolección del Semen en bovinos



Fuente: Molina, 2006

3.4.1.2 Electro eyaculador

3.4.1.2.1 Materiales:

- Toro
- Electro eyaculador
- Agua

- Rasuradora
- Toallas Absorbentes
- Guantes de palpación Rectal
- Gel lubricante
- Cono colector
- Envase de Colección

3.4.1.2.2 Metodología:

- a. Inmovilizar al toro en una manga o prensa y colocar un poste/tubo detrás del animal.
- b. Rasurar y lavar con agua corriente y secar el prepucio, para evitar contaminación en el momento de recogida del semen.
- c. Como parte de examen físico, medir el diámetro de los testículos a través de una cinta métrica.
- d. Usando un guante de palpación rectal, se vacía completamente la materia fecal del recto y aplicar durante 1 a 2 minutos un masaje longitudinal sobre las ampollas deferentes y el músculo uretral.
- e. Lubricar e introducir la sonda dentro del recto con los electrodos dirigidos ventralmente.
- f. Introducida la sonda al recto, se le conecta el cable del electroeyaculador e iniciar lentamente la estimulación eléctrica hasta que el toro muestre una mínima respuesta. Luego aplique estímulos eléctricos consecutivos, aumentando gradualmente la intensidad en cada uno. Cada estímulo debe durar 1-2 segundos, con un descanso de 0.5-1 segundo, antes de iniciar el siguiente. Y cuidar que la sonda no se salga debido a los movimientos del toro.
- g. Después de realizar varios estímulos eléctricos, el pene alcanza el estado de erección extendiéndose por fuera del prepucio, y una secreción pre-seminal transparente es emitida. Esta fracción pre-seminal no debe colectarse. El cono colector debe de tener una cubierta aislante de la temperatura y protector contra los rayos solares.

- h.** Apenas se observe la presencia y salida de la fracción seminal turbia, que es rica en espermatozoides, el cono con el envase de colección se coloca alrededor del glande del pene para recolectar la muestra seminal.
- i.** Después de colectar la muestra seminal deseada, se suspende la estimulación y se retira la sonda rectal.

Figura 8: Recolección del semen Electroeyaculador



Fuente: Gazitúa, 2004

3.4.1.3 Lavado Epididimario

3.4.1.3.1 Materiales:

- Testículos de Toros
- Bolsas de plástico esterilizadas
- Suero Fisiológico
- Medio de lavado PBS modificado
- Aguja calibre 22
- Jeringa de 20 ml
- Tubos de Ensayo

- Bisturí
- Tijeras
- Centrífuga
- Cámara de Newbauer

3.4.1.3.2 Metodología:

1. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se disecarán mediante el uso de implementos estériles y técnicas asépticas. Se removerá la túnica serosa y los vasos sanguíneos con un bisturí con hojilla N° 10 y tijeras.
2. Se localizará el “septum” del epidídimo correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se realizará un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del túbulo se reduzca para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.
3. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocará en un tubo cónico de 50 ml (de centrífuga), y se mantendrá la porción libre de los vasos deferentes sujeta con los dedos pulgar e índice. Se coloca una aguja “con punta roma” (calibre 20,21,22 o 23, según el diámetro interno del vaso deferente) dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptará una jeringa de 10-20 ml llena con “medio de lavado” (PBS modificado), y con esta jeringa se perfundirá lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. Las paredes de los vasos deferentes se presionarán manualmente contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado.
4. A medida que se perfunden los vasos deferentes con el medio de lavado se notará un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, aparecerá en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epidídimo, representado por un líquido espeso y cremoso. En el momento en que el fluido recolectado se haga claro se concluirá el lavado.

5. El fluido obtenido, que deberá contener los espermatozoides epididimarios, se centrifugará a baja velocidad (300 x g) durante 5 minutos para concentrar la muestra. El sobrenadante obtenido se removerá y será descartado.
6. La concentración espermática se determinará usando el hemocitómetro (cámara de Neubauer) y la morfología se evaluará mediante las técnicas tradicionales de evaluación morfológica (frotis teñido con eosina-nigrosina observado al microscopio de contraste de fases).
7. La motilidad y movimientos progresivos de los espermatozoides epididimarios toman entre 40 minutos a 1 hora para comenzar. Transcurrido este lapso, los parámetros de motilidad (individual) y movimientos progresivos podrán ser estimados.

3.4.2 Colección de semen en ovinos

3.4.2.1 Vagina Artificial

3.4.2.1.1 Materiales:

- Carnero
- Hembra en celo
- Vagina Artificial
- Agua
- Jabón
- Vaselina neutra (lubricante)
- Tubo de recolección
- Cepo

3.4.2.1.2 Metodología:

- 1) El macho debe ser preparado e iniciar el entrenamiento de monta, varias veces por un período determinado, utilizando una hembra sana, en calor y mantenida sujeta en un cepo. Hasta que el macho se acostumbre a la presencia del operador.
- 2) Lavar el abdomen en el sector del prepucio con agua tibia y jabón, es recomendable cortar la lana y pelos en este sector para mantener la higiene.
- 3) Preparado el macho, después del tercer salto se procede a la extracción del semen.
- 4) Con la mano derecha, el encargado de la extracción de semen, debe permitir que el pene ingrese a la vagina artificial después del tercer salto lo que provocará la eyaculación. Esto ocurre después que se haya producido el golpe de riñón, movimiento pélvico fuerte hacia adelante, curvando levemente el lomo, este procedimiento no demora más de 30 segundos
- 5) Es recomendable que la vagina artificial, se mantenga cubierta con una cambucha de género para evitar que pase la luz, ya que esta afecta al semen y disminuye su calidad (López, 2005).

3.4.2.2 Electro eyaculador

3.4.2.2.1 Materiales:

- Carnero
- Electro eyaculador
- Tijera
- Agua
- Jabón
- Toallas absorbentes
- Vaselina o gel lubricante

- Gasa
- Tubo de ensayo

3.4.2.2.2 Metodología:

- a) Para la colección de semen, el macho se debe colocar en decúbito lateral, sobre una mesa o en el suelo, siempre que esté limpio. Se deben cortar el pelo o lana que bordee la vaina y el prepucio se debe limpiar correctamente.
- b) La sonda se humedece o lubrica con vaselina y se inserta en el recto a una profundidad de 15-20 cm, procurando no lesionar la mucosa.
- c) El pene se debe extender por enderezamiento de la flexura sigmoidea de tal forma que el glande del pené se pueda sujetar con la mano limpia y liberar el pené del prepucio. Por detrás del glande se coloca una pieza de gasa y se introduce el glande y el proceso uretral en un tubo de ensayo estéril.
- d) Lo mejor es sujetar el pené y el tubo de ensayo con la misma mano dejando la otra libre para dar masaje en el pené en dirección hacia delante entre cada estímulo eléctrico.
- e) Un ayudante debe presionar sobre la sonda hacia el suelo de la pelvis, aplicándose luego cortos estímulos (3-8 segundos) a intervalos de 15-20 segundos. Después de unos cuantos estímulos fluirá la secreción de las glándulas accesorias y luego el semen. Cuando se obtenga inicialmente grandes cantidades de líquido claro, se deben desechar para evitar diluciones innecesarias del semen (Salisbury, 1982).

3.4.2.3 Lavado Epididimario

3.4.2.3.1 Materiales:

- Testículos
- Bolsas de plástico esterilizadas

- Suero Fisiológico
- Medio de lavado PBS modificado
- Aguja calibre 22
- Jeringa de 20 ml
- Tubos de Ensayo
- Bisturí
- Tijeras
- Centrífuga
- Cámara de Newbauer

3.4.2.3.2 Metodología:

1. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se diseccionarán mediante el uso de implementos estériles y técnicas asépticas. Se removerá la túnica serosa y los vasos sanguíneos con un bisturí con hojilla N° 10 y tijeras.
2. Se localizará el “septum” del epidídimo correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se realizará un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del túbulo se reduzca para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.
3. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocará en un tubo cónico de 50 ml (de centrífuga), y se mantendrá la porción libre de los vasos deferentes sujeta con los dedos pulgar e índice. Se coloca una aguja “con punta roma” (calibre 20, 21, 22 o 23, según el diámetro interno del vaso deferente) dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptará una jeringa de 10-20 ml llena con “medio de lavado” (PBS modificado), y con esta jeringa se perfundirá lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. Las paredes de los vasos deferentes se presionarán manualmente contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado.

4. A medida que se perfunden los vasos deferentes con el medio de lavado se notará un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, aparecerá en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epidídimo, representado por un líquido espeso y cremoso. En el momento en que el fluido recolectado se haga claro se concluirá el lavado.
5. El fluido obtenido, que deberá contener los espermatozoides epidídimos, se centrifugará a baja velocidad (300 x g) durante 5 minutos para concentrar la muestra. El sobrenadante obtenido se removerá y será descartado.
6. La concentración espermática se determinará usando el hemocitómetro (cámara de Neubauer) y la morfología se evaluará mediante las técnicas tradicionales de evaluación morfológica (frotis teñido con eosina-nigrosina observado al microscopio de contraste de fases).
7. La motilidad y movimientos progresivos de los espermatozoides epidídimos toman entre 40 minutos a 1 hora para comenzar. Transcurrido este lapso, los parámetros de motilidad (individual) y movimientos progresivos podrán ser estimados (Trón, 2004).

3.4.3 Colección de semen en porcinos

3.4.3.1 Por Presión

3.4.3.1.1 Materiales:

- Corral de Monta
- Maniquí
- Termo de colecta
- Vaso de precipitación de 500 ml

- Gasa estéril
- Ligas
- Termómetro
- Baño María
- Toallas

3.4.3.1.2 Metodología:

- a) Una vez que el verraco efectúa la monta y deja al descubierto el pene, se coloca el dorso de la mano contra la pared ventral del abdomen por delante del orificio prepucial, sujetándolo suavemente y ejerciendo una ligera tracción hacia delante con el fin de lograr su amplexación.
- b) Se debe aplicar una presión digital rítmica a 2 o 3 cm distal del pene para estimular la eyaculación, la cual puede durar de 4 a 10 minutos.
- c) El eyaculado se recoge en un termo de colecta en el que previamente se coloca un filtro de gasa para evitar el paso de los gránulos de tapioca, evitando la luz directa protegiéndolo con una toalla estéril, se traspasa el semen a un vaso de precipitación y se lleva a baño maría para su posterior evaluación.

Figura 9: Recolección del Semen en porcinos



Fuente: Badillo, 2005

3.4.4 Colección de semen en caprinos

3.4.4.1 Vagina Artificial

3.4.4.1.1 Materiales:

- Hembra en celo
- Vagina artificial
- Agua Caliente
- Tubo de recolección seminal templado y seco
- Agua
- Toallas absorbentes
- Tijeras
- Cepo
- Baño María

3.4.4.1.2 Metodología:

1. Es importante comenzar con el entrenamiento de los machos al menos 2 meses antes de su inclusión en un programa de extracción seminal. Para ello, los animales son entrenados para realizar el salto en la vagina artificial.
2. La vagina artificial se acondiciona con 40-60 cc de agua caliente a 50-70 °C, según las pérdidas de calor que se produzcan hasta el momento de su utilización, siendo importante que la temperatura interior de la vagina artificial al momento de la eyaculación, sea de aproximadamente de 38°C. A uno de sus extremos, se adosa un tubo de recolección seminal templado y seco. El acondicionamiento final de la vagina se logra por el agregado de aire a la cámara de agua, con el fin de estrechar la luz vaginal aproximadamente a 1cm de diámetro.
3. La recolección del semen se realiza en un lugar limpio y libre de polvo. Se lava y seca el vientre y el prepucio del macho y se recortan los pelos prepuciales para evitar la contaminación del semen cuando se efectúa la colecta seminal.
4. Asegurada la cabra en un cepo, el operador se sitúa al lado de la hembra, sujetando la vagina artificial con el extremo abierto frente al prepucio en un ángulo de 45°. Un “golpe” del animal hacia arriba y hacia adelante indica que la eyaculación ha ocurrido. El tubo de recolección se protege de los cambios bruscos de temperatura y se coloca en un baño de agua a 36°C.
5. La frecuencia de obtención de está supeditada a la libido de cada macho en particular. Para un programa de congelamiento se recomienda obtener uno o dos eyaculados diarios, durante 45 días seguidos y dar descansos de 2-3 días.

3.4.4.2 Electro eyaculador

3.4.4.2.1 Materiales:

- Electro eyaculador
- Manga
- Poste
- Agua
- Rasuradora
- Gasa
- Toallas Absorbentes
- Gel lubricante
- Tubo o envase de colección

3.4.4.2.2 Metodología:

- a) Para la extracción de semen por electro eyaculador se recomienda tener una manga de 76 cm de ancho que puede albergar a la mayoría de los animales grandes. Se debe colocar detrás del individuo un poste fuerte a una altura ideal entre 71 y 76 cm y otro a 30 cm del suelo como corrector durante el procedimiento, dado que es posible que los animales pierdan el equilibrio.
- b) La primera estimulación debe ser pequeña hasta que el macho demuestre una mínima respuesta. Las estimulaciones sucesivas deben ir siendo incrementadas de a poco, con una duración de uno o dos segundos y luego discontinuarse por medio segundo antes de comenzar con la siguiente estimulación.
- c) El fluido preseminal no debe recolectarse porque diluye el eyaculado y puede originar falsos resultados. Cuando éste comienza a tornarse más opaco y espeso comienza la colección en el cono o tubo de examinación colocado directamente en el pene.

- d) Si el animal no protruye el pene, el ayudante debe presionar sobre la flexura sigmoidea detrás del escroto y el operador debe estar listo con una gasa para tomarlo apenas protruya.
- e) Aunque la estimulación se continúa hasta la obtención de 2 a 5 ml de semen, la cantidad de éste no tiene mucho que ver con la calidad. La mayoría de los animales eyaculan sin mucha estimulación, sin embargo, si se ha alcanzado el máximo de estímulos sin obtener la eyaculación se deben dar 4 o 5 estímulos máximos seguidos de uno o dos minutos de descanso.
- f) Como conclusión se puede afirmar que este es un método completamente antinatural, muy traumático para el animal, y que debe tratar de emplearse sólo como último recurso, como cuando no se ha podido de ninguna manera extraerle semen por medio de la vagina artificial u otros métodos.

3.4.5 Colección de semen en conejos

3.4.5.1 Vagina Artificial

3.4.5.1.1 Materiales:

- Coneja
- Vagina artificial
- Agua
- Guantes desechables
- Tubo colector
- Tubo de centrifuga graduado

3.4.5.1.2 Metodología:

- a) Se introduce la coneja en la jaula del macho tomándola por las orejas y el dorso simultáneamente en posición de servicio.
- b) Cuando el macho salta, se coloca la vagina artificial con la mano libre entre la grupa de la coneja y el vientre del conejo. A continuación el macho busca activamente la vulva de la coneja y encuentra, en su lugar, la vagina artificial.
- c) El conejo eyacula instantáneamente y aprovechando la deyección del macho después de la eyaculación, se saca la coneja de la jaula.
- d) Una vez terminado el salto se observa en el tubo colector y si el eyaculado presenta tapón mucoso o gel procedente de la secreción de las vesículas seminales o de la próstata, se debe retirar porque resulta perjudicial ya que aglutina los espermatozoides, provocando la pérdida de movilidad.

Figura 10 : Recolección de Semen en Conejos



Fuente: Losada, 2010

3.4.6 Colección de semen en cuyes

3.4.6.1 Lavado Epidídimario

3.4.6.1.1 Materiales:

- Testículos
- Bolsas de plástico esterilizadas
- Suero Fisiológico
- Medio de lavado PBS modificado
- Aguja calibre 22
- Jeringa de 20 ml
- Tubos de Ensayo
- Bisturí
- Tijeras
- Centrífuga
- Cámara de Newbauer

3.4.6.1.2 Metodología:

1. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se disecarán mediante el uso de implementos estériles y técnicas asépticas. Se removerá la túnica serosa y los vasos sanguíneos con un bisturí con hojilla N° 10 y tijeras.
2. Se localizará el “septum” del epidídimo correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se realizará un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del túbulo se reduzca para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.
3. La porción disecada de la cola del epidídimo se colocará en un tubo cónico de 50 ml (de centrífuga), y se mantendrá la porción libre de los vasos deferentes

sujeta con los dedos pulgar e índice. Se coloca una aguja “con punta roma” (calibre 20, 21, 22 o 23, según el diámetro interno del vaso deferente) dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente. Se adaptará una jeringa de 10-20 ml llena con “medio de lavado” (PBS modificado), y con esta jeringa se perfundirá lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. Las paredes de los vasos deferentes se presionarán manualmente contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado.

4. A medida que se perfunden los vasos deferentes con el medio de lavado se notará un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, aparecerá en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario, representado por un líquido espeso y cremoso. En el momento en que el fluido recolectado se haga claro se concluirá el lavado.
5. El fluido obtenido, que deberá contener los espermatozoides epididimarios, se centrifugará a baja velocidad (300 x g) durante 5 minutos para concentrar la muestra. El sobrenadante obtenido se removerá y será descartado.
6. La concentración espermática se determinará usando el hemocitómetro (cámara de Neubauer) y la morfología se evaluará mediante las técnicas tradicionales de evaluación morfológica (frotis teñido con eosina-nigrosina observado al microscopio de contraste de fases).
7. La motilidad y movimientos progresivos de los espermatozoides epididimarios toman entre 40 minutos a 1 hora para comenzar. Transcurrido este lapso, los parámetros de motilidad (individual) y movimientos progresivos podrán ser estimados.

3.4.7 Colección de semen en caninos

3.4.7.1 Método Manual

3.4.7.1.1 Materiales:

- Hembra en estro
- Guantes
- Tubo de ensayo
- Embudo de látex
- Toallas Absorbentes

3.4.7.1.2 Metodología:

1. La extracción se logra masajeando sobre el prepucio para lograr una erección parcial y luego se presiona sobre el bulbo del glande protruyéndolo fuera del prepucio y tomándolo fuertemente con la mano.
2. Con la otra mano se sostiene el recipiente recolector, evitando que toque la mucosa peneana, pues de hacerlo se producirá un sangrado abundante que inutilizara el material.
3. La primera fracción del eyaculado es descartable. La segunda fracción es la parte importante pues la que contiene los espermatozoides. La tercera fracción (fracción prostática) es descartable, se recoge lo necesario para mantener un volumen físico manejable.
4. Cuando se utilice una perra en estro para estimular al macho, se permitirá que el macho monte y en el momento en el que el perro desenvaine se desviará el pene hacia atrás con la mano.
5. El material más sencillo para recolectar semen es un embudo, un tubo de ensayo y un guante para manipular el pene con la mano enguantada.

6. El embudo de látex es de gran utilidad, ya que éste sujeta y oprime al pene del perro, logrando así dos objetivos, el que no se vaya a derramar el eyaculado al piso con cualquier movimiento del animal y el segundo es que la misma presión ayude a estimular la eyaculación.

3.5 PRÁCTICA N° 02

3.5.1 Procesamiento del semen

3.5.1.1 Introducción

Los espermatozoides son únicos entre las células en su forma y función son células terminales, el producto final de procesos de desarrollo complejos. El método estándar para evaluar la fertilidad de machos reproductores, aparte de la evaluación directa de su capacidad para causar una preñez, es el examen del semen.

La evaluación de semen tiene como finalidad predecir su fertilidad potencial. Si bien, ningún examen in vitro tiene alta correlación con la fertilidad, hay diversas pruebas de laboratorio que correctamente interpretadas nos permiten estimar la calidad seminal, y especialmente son muy útiles para detectar partidas con las que no se obtendrán buenos resultados en la Inseminación Artificial.

Aunque ninguna prueba por sí sola puede predecir con exactitud la fertilidad de una muestra de espermatozoides, el examen de diversas características físicas del semen puede determinar mayor potencial de fertilidad.

3.5.2 Objetivos

- ✓ Demostrar la importancia que tiene realizar un análisis de calidad seminal previamente a ejecutar un programa de Inseminación artificial.
- ✓ Evaluar la fertilidad de machos reproductores a través del examen de semen.

- ✓ Determinar los parámetros que reflejan la calidad y el buen estado del semen colectado.

3.5.3 Materiales:

- Tubo de recolección de vidrio
- Tiras reactivas de Ph
- Pipetas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

3.5.4 Equipos:

- Microscopio de campo claro
- Microscopio de contraste de fase
- Espermatocitómetro
- Cámara de Newbauer

3.5.5 Reactivos-Soluciones:

- Diluyentes
- Colorantes

3.5.6 Metodología:

El examen del semen debe realizarse inmediatamente después de la extracción, trabajándose en condiciones de medio ambiente constante (temperatura de laboratorio alrededor de 22-25°C) manteniendo el semen a una temperatura de unos 35 a 37°C. Se usan en la comprobación del semen las pruebas siguientes:

- a) Examen macroscópico.
- b) Examen microscópico.

3.5.6.1 Características Macroscópicas

Mediante esta estimación realizada a simple vista se obtienen datos que permiten evaluar, a grandes rasgos, algunos aspectos cualitativos y cuantitativos del semen.

3.5.6.1.1 Volúmen.-

Se expresa en mililitros (ml), valiéndose de la graduación inscrita en el tubo de recolección de vidrio. Como es sabido, este parámetro varía en función de:

- Especie
- Edad
- Raza
- Estado fisiológico del individuo
- Método de recolección
- Estado nutricional
- Frecuencia de recolección
- Excitación sexual
- Época del año
- Peso vivo del animal

Cuadro 1: Volumen de semen de diferentes especies

ESPECIE	VOLUMEN DE SEMEN
Bovino	2 y 20 ml
Porcino	40 a 500 ml
Canino	0.1 a 1.5 ml
Ovino	0.3 – 6.0 ml

Fuente: Barth, 2007

3.5.6.1.2 Color y densidad.-

Normalmente el semen de los animales suele ser de un color blanco cremoso, pero esto está en estrecha relación con la cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado, es decir con la concentración espermática. Existe una alta y positiva correlación entre viscosidad y concentración de espermatozoides. Cuando la densidad es normal, el semen tiene aspecto parecido al de la crema de leche.

La coloración amarillenta se debe a la riboflavina segregada por las glándulas vesiculares y ampollas del conducto deferente, no teniendo ningún tipo de significación clínica. Otras veces puede deberse a la presencia de pus (piospermia) u orina, y en ambos casos el poder fecundante de los animales puede estar comprometido; recordemos que la presencia de pus indica inflamación, y que la orina es espermicida.

Una coloración rojiza puede ocurrir por la presencia de sangre en los casos en que existan heridas de pene y prepucio o tracto genital, o bien a causa de heridas y lesiones en el momento mismo de la recolección, produciéndose hemorragias y contaminando el eyaculado. El semen con estas características ha de ser descartado, ya que los eosinófilos presentan una enzima (amilasa) que destruye los factores de capacitación producidos en el epidídimo.

Cuadro 2: Densidad y Color del semen

Muy Buena (MB)	Semen cremoso, granular con 750 a 1000 millones de espermatozoides/ml o más
Buena (B)	Semen lechoso con 400 a 750 millones de espermatozoides/ml
Suficiente (S)	Semen semejante a leche descremada con 250 a 400 millones de espermatozoides/ml
Pobre (P)	Semen translúcido con menos de 250 millones de espermatozoides/ml

Fuente: Molina, 2006

3.5.6.1.3 pH.-

Muchos autores han minimizado los cambios de Ph del semen, ya que infinidad de factores como temperatura de conservación, método de extracción, concentración espermática y muchos más parecen influenciarlo. Lo cierto es que su determinación es muy sencilla con las tiras reactivas específicas para tal fin, colocando unas gotas de semen en ellas, estando sostenidas por una pinza.

El pH normal del semen bovino es cercano a la neutralidad, de 6.7 a 7; este parámetro no varía mucho en las distintas especies animales. Ante la sospecha de cualquier afección inflamatoria de uno de los órganos genitales, se verificará con éste método un aumento del pH (tendencia a la alcalinidad).

3.5.6.2 Características Microscópicas

Es necesario para este tipo de evaluación que todo el material de vidrio se encuentre a 37°C (pipetas, portaobjetos, cubreobjetos, diluyentes, colorantes).

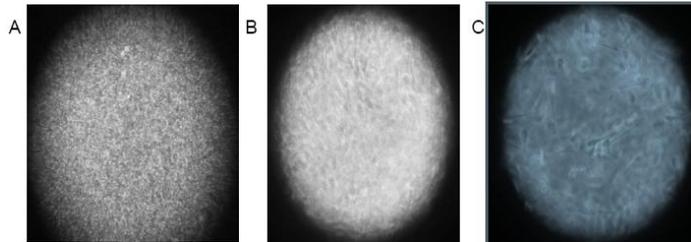
El examen microscópico del semen fresco es de una importancia absoluta para juzgar el destino del eyaculado obtenido, es decir su procesamiento para inseminación artificial o su descarte.

3.5.6.2.1 Motilidad o movimiento en masa.-

Se coloca una gota de semen de 5 mm de diámetro sobre un portaobjetos precalentado, y se observa el movimiento en masa de los espermatozoides usando microscopía de campo claro, el diafragma de campo cerrado y con magnificación de 40x. Los factores que influyen en el movimiento en masa de los espermatozoides son la concentración, el porcentaje de células con movimiento progresivo y la velocidad/vigor del

movimiento de los espermatozoides. Si uno o más de estos factores se encuentran comprometidos, el movimiento en masa se reducirá.

Figura 11: Movimiento en masa de espermatozoides



Fuente: Barth, 2007

Cuadro 3: Clasificación de motilidad en masa del semen

Muy bueno	Movimientos masivo muy marcado y rápidos	70-100%
Bueno	Movimientos en masa aparente, pero moderados	50-69%
Suficiente	Ondas en movimientos apenas apreciables	30-49%
Pobre	No hay ondas, semen sin movimiento	Menos de 30%

Fuente: Valencia, 2006

Cuadro 4: Calificación descriptiva del movimiento en masa

Muy Bueno (MB)	Remolinos oscuros y rápidos
Bueno (B)	Remolinos lentos
Regular (R)	Sin remolinos, pero movimiento de células individuales
Pobre (P)	Poco o nada de movimiento celular individual

Fuente: Barth, 2007

3.5.6.2.2 Motilidad individual progresiva.-

Se coloca un volumen de 5 a 7 μ l de semen sobre un portaobjetos nuevo y precalentado creando una gota aproximadamente de 3 a 5 mm de diámetro, que luego se cubre con una laminilla cubreobjetos.

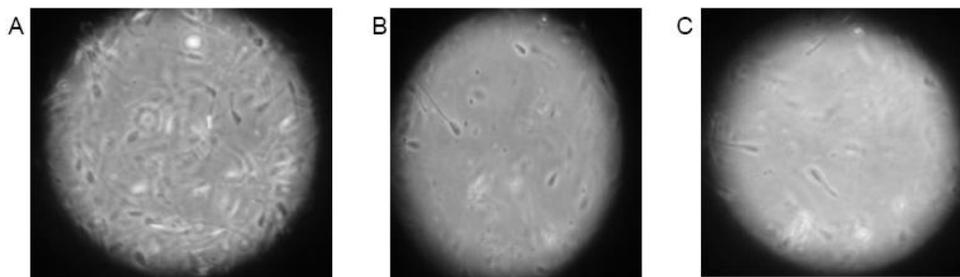
La muestra es observada con microscopía de contraste de fase y con aumento de 200-400x, determinando el porcentaje de células espermáticas con movimiento progresivo lineal. Si el semen está muy concentrado, la muestra puede diluirse con una solución amortiguadora o diluyente de semen antes de colocar el cubreobjetos.

Cuadro 5: Evaluación descriptiva de la motilidad individual

Muy Buena (MB)	80 – 100% con motilidad progresiva
Buena (B)	60 – 79% con motilidad progresiva
Regular (R)	40 – 59% con motilidad progresiva
Pobre (P)	<40% con motilidad progresiva

Fuente: Molina, 2006

Figura 12: Evaluación de la motilidad individual (A, B, C.)



Fuente: Rodríguez, 2005

3.5.6.2.3 Morfología.-

El espermatozoide puede realizar sus funciones biológicas fundamentales sólo cuando está cualitativa y morfológicamente bien constituido, es decir, cuando posee la estructura típica de la cabeza, cuello, parte intermedia y cola.

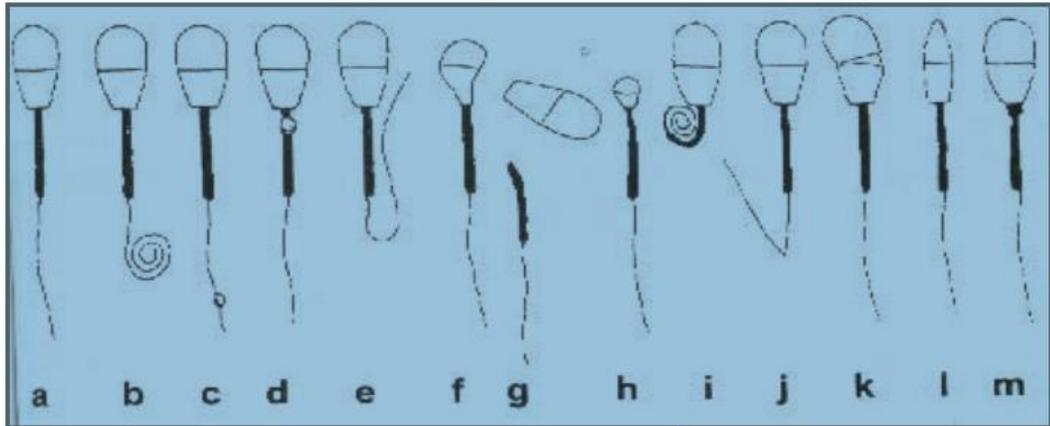
La posibilidad de fertilización del óvulo y la formación del nuevo individuo sano, depende de la composición y constitución de la cabeza que conduce la información genética y el sistema acrosomal. Sin embargo, la cabeza puede realizar esta tarea solamente en dependencia de la función y constitución del sistema locomotor, como son el cuello, parte intermedia y cola. De este modo un espermatozoide forma una unidad donde cada parte cumple su función determinada en un tiempo conveniente.

Es posible decir que la estructura morfológica del espermatozoide es una característica vital y su evaluación crítica indica de modo extraordinario la capacidad de fecundar del espermatozoide y, por último, la calidad total del semen.

Para observar la cantidad de espermatozoides vivos y las anomalías, generalmente se mezcla el semen con colorantes y se realiza un frotis.

- Existe gran cantidad de tinciones como: eosina-nigrosina, rojo de Bengala, Azul de Victoria, Wells, Williams, Giemsa, tinta china, Fuchina Fenicada, violeta de metilo, anilina y coloración de Karras, preparaciones líquidas (solución de Hancock mezcladas con el semen y observarlas al microscopio de contraste de fase. Por lo común, se cuenta 300 espermatozoides en varios campos y se anotan los alterados y el tipo de alteración.

Figura 13: Algunas anomalías frecuentes en los espermatozoides



Fuente: Schaetz, 2006

a) Espermatozoide normal; b) cola enrollada próxima; c) gota citoplásmica distal; d) gota citoplásmica proximal; e) cola doblada; f) cabeza anormal pequeña; g) cabeza ó cola suelta; h) cabeza normal pequeña; i) cola enrollada; j) cola quebrada; k) membrana acrosomal pérdida; l) contorno cefálico anormal; m) cuello ancho.

Cuadro 6: Morfología Espermática

Anormalidades Espermáticas	Anormalidades Espermáticas
Subdesarrollados	Cabezas pequeñas normales
Formas dobles	Cabezas anchas pequeñas
Defectos Acrosomales	Cabezas normales libres
Cabezas angostas	Membranas acrosomales sueltas
Defecto cráter/diadema	Implantación abaxial
Defecto forma de pera	Gotas distales
Contorno anormal	Flagelo doblado simple
Cabezas pequeñas anormales	Terminación del Flagelo plegado
Cabezas sueltas anormales	Otras células
Piezas medias anormales	Células Epiteliales
Gotas proximales	Eritrocitos
Flagelo fuertemente plegados	Formaciones de medusa
Flagelo enrollados	Células precursoras de esperma
Flagelo Accesorios	Células redondas
	Glóbulos blancos

Fuente: Holy, 2005

3.5.6.3 Métodos para calcular la concentración o densidad

1. Hemocitómetro de Spencer

Este método es el mismo que se utiliza para el conteo de glóbulos rojos. La dilución se efectúa con la pipeta de glóbulos rojos (dilución 1:100 o 1:200) utilizando una solución salina al 3% con formalina para matar a los espermatozoides y poder contarlos sobre la cuadrícula de cámara de Spencer

2. Espectrofotómetro y fotocolorímetro

Consiste en hacer una dilución de semen 1:40 y medir la transmisión de la muestra en el aparato. Previamente se construirá una curva de calibración con concentraciones conocidas para poder determinar la cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado.

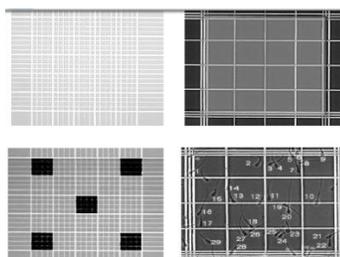
3. Espermaticitómetro o espermaticrito

Se basa en el principio del hematocrito. Al centrifugar al semen en una micropipeta se separa el paquete celular y el plasma seminal. La relación entre los dos permite calcular el número de espermatozoides en un volumen fijo.

4. Método Manual (hemocitómetro o cámara de newbauer)

Es un método barato, lento y preciso

Figura 14: Conteo de espermatozoides con cámara de newbauer



Fuente: Holy, 2005

Ejemplo para calcular la concentración:

- El área que se cuenta es de 1mm. El cubreobjetos está 0.1mm arriba del piso de la cámara. Por lo tanto el volumen que se está contando es de 0.1mm³ o 0.1 microlítro.
- Entonces se multiplica el promedio de las dos cámaras por 10,000 para obtener la concentración por ml de la muestra diluida.
- O sea que para calcular la concentración del eyaculado original: Se saca el promedio de las dos cámaras, multiplicarlo por 10,000, y multiplicar eso por el factor de dilución.
- **Ejemplo:** Si se diluye una muestra con 0.1ml de semen y 9.9ml de agua es una dilución 1:100. Supongamos que en las cámaras se contaron 128 y 132 espermatozoides.
- El promedio es $130 \times 5 = 650$ espermatozoides en el área de conteo (650 células por 0.1 microlitro).
- Multiplica 650 por 10,000 para obtener la concentración en la muestra diluida (respuesta = 6,500,000)
- Multiplica 6,500,000 por 100 (el factor de dilución) = 650,000,000 por ml de la muestra original.

3.6 PRACTICA N° 03

Crioconservación de semen

3.6.1 Introducción

El éxito de la crioconservación de espermatozoides depende del mantenimiento del potencial fertilizante de los espermatozoides, que deben ofrecer la integridad y funcionalidad de las diferentes estructuras celulares.

Los espermatozoides capaces de fecundar el ovocito, deben mantener al menos cuatro atributos básicos después de la congelación y descongelación, entre ellos el metabolismo para producir energía, la motilidad progresiva, las enzimas acrosómicas importantes para la penetración de los espermatozoides a través de las estructuras que rodean al ovocito, y las proteínas de la membrana plasmática importantes para la supervivencia de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino y para su conexión a la membrana del ovocito durante la fecundación.

El proceso de Crioconservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular, pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas.

3.6.2 Objetivos

- ✓ Aportar información sobre aspectos básicos del proceso de crioconservación seminal y proporcionar al personal de laboratorio la información técnica necesaria para instaurar dicho proceso.
- ✓ Mantener la viabilidad y funcionalidad a bajas temperaturas durante largos períodos de tiempo frenando los procesos de envejecimiento y degeneración celular.
- ✓ Conservar el uso de reproductores mucho después de finalizado su período útil como semental y almacenar su material genético por tiempo indefinido, siendo de gran relevancia este punto para su aplicación en diversas especies.

3.6.3 Crioconservación de semen bovino, ovino, caprino con andromed

3.6.3.1 Materiales:

- Agua Destilada
- Baño-maría
- Rampas-Vapor Nitrógeno

3.6.3.2 Reactivos-Soluciones:

- Diluyente Andromed

3.6.3.3 Equipos:

- Congelador de Semen profesional

3.6.3.4 Metodología:

Diluyente sin yema de huevo para la conservación de semen, es apropiado para la congelación de semen y para la conservación de semen en fresco. Andromed se utiliza para semen de bovino, caprino, ovino y ciervo.

Composición

- ✓ Fosfolípidos
- ✓ Tris
- ✓ Acido cítrico
- ✓ Azúcares
- ✓ Antioxidantes
- ✓ Tampones

- ✓ Glicerina
- ✓ Agua de altísima pureza
- ✓ Antibióticos: (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

Indicaciones de uso

La preparación es simple: se requiere añadir sólo 800 ml de agua destilada al contenido de 200 ml de un frasco de Andromed. Andromed es un medio altamente transparente que entrega imágenes de semen extremadamente claras bajo el microscopio.

Los eyaculados de calidad cuestionable pueden ser detectados y evaluados fácilmente, en base a un estándar de selección definido. La eficiencia es alta dentro de las concentraciones estándar de dosis: la tasa de dilución de los eyaculados puede variarse en gran medida, manteniendo resultados sobresalientes. Andromed está siendo utilizado con eyaculados de baja concentración y a altas tasas de dilución (bajo 10 millones de células por pajuela).

Preparación del diluyente final

- a) El contenido (200 ml) de un frasco de Andromed debe diluirse con 800 ml de agua destilada estéril previamente temperada a +30°C hasta +35°C. Es posible preparar volúmenes menores, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado. Para lograr las propiedades óptimas de conservación de Andromed, la cantidad requerida de agua debe agregarse al concentrado y no viceversa.
- b) El diluyente preparado Andromed debe temperarse antes de su uso en un baño-maría entre +30°C y +32°C.
- c) Predilución y análisis de semen: Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado deberá ser evaluado (concentración, motilidad) y entonces prediluido 1+1 (Ávila, 2006).
- d) El eyaculado deberá mantenerse en el baño-maría entre +30°C y +32°C. Al momento de la dilución, el diluyente debe tener la misma temperatura que el

eyaculado ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). El semen no deberá permanecer en el baño-maría por más de 10 minutos. Una vez evaluado debe efectuarse la dilución final. El eyaculado ha alcanzado hasta entonces la temperatura de laboratorio ($+20^{\circ}\text{C}$ a $+23^{\circ}\text{C}$), y a esa temperatura es envasado en pajuelas. En forma alternativa, Andromed puede utilizarse para el envasado de las pajuelas a $+5^{\circ}\text{C}$. Para ello, el semen diluido debe ser equilibrado por al menos 2 a 3 horas a $+5^{\circ}\text{C}$.

- e) **Congelación de pajuelas:** La congelación de pajuelas se efectúa sobre rampas en vapor de Nitrógeno, a una altura de 4 cm sobre el nivel del Nitrógeno líquido, o en un congelador de semen profesional con una temperatura inicial de -120°C . El proceso de congelación en un congelador automático deberá extenderse por al menos 7 minutos con mini-pajuelas (0,25 ml) y 10 minutos con pajuelas medianas (0,5 ml) (Ávila, 2006).

Presentación

Cada frasco de Andromed contiene 200 ml de concentrado para la preparación de 1000 ml de diluyente listo para su utilización.

3.6.4 Crioconservación de semen en conejo, cuy, caninos con triladyl

3.6.4.1 Materiales:

- Huevos
- Probeta estéril
- Matraz de Erlenmeyer
- Papel
- Declarador
- Agitador magnético
- Baño maría
- Jeringa de insulina

3.6.4.2 Reactivos- Soluciones:

- Diluyente
- Agua Destilada
- Alcohol

3.6.4.3 Equipos:

- Congelador de semen
- Rampas de Nitrógeno
- Termo de Nitrógeno

3.6.4.4 Metodología:

Composición

- ✓ TRIS
- ✓ Ácido cítrico
- ✓ Azúcar
- ✓ Tampones
- ✓ Glicerina
- ✓ Antibióticos
- ✓ Agua de extrema pureza
- ✓ 100 ml del diluyente preparado contienen (unidades activas)
- ✓ Tilosina 5,7 mg
- ✓ Gentamicina 28,6 mg
- ✓ Espectinomicina 34,3 mg
- ✓ Lincomicina 17,2 mg

Preparación del Diluyente

- a) Para la preparación del diluyente se requiere de Triladyl concentrado, agua pura estéril, yema de huevo fresco, probeta estéril o matraz de Erlenmeyer.
- b) Para la obtención de la yema del huevo, se puede limpiar la cáscara del huevo enjuagándolo con agua destilada y posteriormente se limpia con alcohol. En seguida se parten los huevos cuidadosamente, tratando de separar yema y clara con un declarador, vertiendo la yema, sin romperla sobre una sanita y se hace rodar sobre el papel tratando de retirar todo el resto de la clara.
- c) El borde del papel, se envuelve y se presiona para abrir la membrana de tal forma, que la yema escurra libremente, dejando adherida la membrana al papel, otra opción es con una jeringa romper la membrana de la yema y tomar los mililitros necesarios (Holy, 2005).
- d) Enseguida, se le agrega a la yema lentamente la solución de agua destilada con el triladyl y se mezcla, con agitador magnético ó una varilla de vidrio estéril. La observación estricta de este orden es de importancia para permitir el total desarrollo de las cualidades de conservación del Triladyl (agregar la solución madre a la yema, no al revés).

Recomendaciones técnicas

Después de colectar el semen, el eyaculado es mantenido en un baño maría a +28°C a +30°C. Una vez evaluado mediante examen macroscópico y microscópico, se prediluye el semen 1:1 en el mismo vaso colector, dejando escurrir lentamente el diluyente a lo largo de la pared del vaso. Una vez calculada la dilución final, el semen prediluido es vertido cuidadosamente, a lo largo de su pared, a un envase temperado de mayor tamaño, agregando a continuación el volumen de diluyente aún requerido. Es conveniente agitar el envase durante la dilución, para lograr una adecuada mezcla del semen con el diluyente.

Procesamiento del semen con Triladyl

El procesamiento del semen enfriándolo a 5°C es similar, ya sea que se use congelado o sin congelar. El semen se colecta a la temperatura corporal. Después de la obtención debe mantenerse tibio (37°C) antes de la dilución, para evitar el choque por frío. Esto se realiza colocando semen y diluyente triladyl en un baño maría. Se extrae una porción de semen para evaluación, y el resto se mezcla con una parte igual de volumen de diluyente. Esta predilución se introduce en un baño de agua a temperatura ambiente (+/- 25-28°C) para empezar a enfriar y permanecerá en este baño de agua por 10 minutos. Luego se introduce a un refrigerador aproximadamente 2 horas hasta que alcance una temperatura de 5°C.

Congelación

Para el empaque o empajillado, se lleva el semen diluido al congelador donde se busca una temperatura de 5°C. Y con una jeringa de insulina cargar la muestra dejando un espacio vacío para cargar aire. Y se sellan a presión con una pinza previamente calentada.

Luego se colocan las pajillas en una rampa con temperatura de 5°C y se lleva a los vapores de nitrógeno (Temp. -120, -130°C) por 7 minutos.

Después de los 7 minutos, las pajillas se dejan caer al nitrógeno y se llenan los contenedores individuales de pajillas para luego llevarlas al termo de nitrógeno.

Tipos de empaque.- Los espermatozoides se pueden empacar de tres maneras:

- a) Las pajillas de policloruro de vinilo con 0.25 a 0.5 ml de semen diluido.
- b) Ampolletas de vidrio con 0.5 a 1 ml.
- c) Píldoras conteniendo alrededor de 0.1 a 0.2 ml.

Descongelación del semen

El tiempo de descongelamiento debe controlarse con cuidado para evitar matar las células por sobrecalentamiento. Se recomienda que en condiciones de campo las

ampolletas se descongelen en agua con hielo; esto requiere unos 8 min. Pueden ser mejores temperaturas más altas (37°C) en el caso de las pajillas, pero esto suele depender del diluyente. Las píldoras se descongelan mejor en un medio líquido a 40°C, pero en condiciones prácticas de campo, un baño en agua con hielo es más fácil de mantener y resulta satisfactorio.

3.6.5 Crioconservacion de semen en porcinos con x-cell

3.6.5.1 Materiales:

- Termómetro
- Baño maría
- Pajuelas
- Pipetas

3.6.5.2 Reactivos-Soluciones:

- Diluyente : X-cell

3.6.5.3 Equipos:

- Tanque de nitrógeno líquido

3.6.5.4 Metodología:

El X-cell es un diluyente que protege realmente al semen, mejora la conservación incluso en semen delicado (razas puras, semen que se deteriora fácilmente), o semen sometido a variaciones de temperatura estacionales o de transporte.

El medio de conservación X-cell es un medio enriquecido, incrementa la viabilidad de los espermatozoides y mantiene el poder fecundante a bajas concentraciones.

Composición

Este diluyente basa su composición en diferentes mezclas de sales y azúcares no contienen yema de huevo o leche como en las demás especies.

- ✓ Energía: Glucosa
- ✓ Buffers: Bicarbonato de sodio
- ✓ Electrolitos: cloruro de potasio o de sodio
- ✓ Estabilizadores de membrana
- ✓ Antibióticos: gentamicina, lincomicina, espectinomicina.

Dilución del semen

Posterior a la dilución debemos reducir la temperatura en forma gradual (2 0 3 horas) hasta la temperatura de conservación. Es importante destacar q el semen es diluido a 32-34°C y la temperatura de conservación ideal del semen de verraco varía entre 15 - 20°C. A esta temperatura, existe una disminución del metabolismo y de la motilidad espermática. Del mismo modo, también se contribuye a frenar el crecimiento bacteriano. Está demostrado que es más importante controlar la fluctuación de temperatura del semen conservado que la temperatura en sí.

Temperaturas de conservación de semen diluido con diluyentes clásicos, por debajo de los 14°C son responsables de alteraciones de la membrana del espermatozoide repercutiéndose en el poder fecundante del mismo. Temperaturas por encima de los 20°C no bajan el metabolismo espermático ni frenan el crecimiento bacteriano, lo cual disminuye enormemente la vida útil del semen.

CONCLUSIONES

- Es una herramienta que contiene una descripción precisa, explica paso a paso como realizar una práctica y de cómo deben desarrollarse las actividades, es un documento interno, en el cual se detallan políticas y procedimientos para el desarrollo de operaciones y registro de actividades.

- El manual es considerado como un medio de información que a través de la aplicación de habilidades y destrezas permite establecer diferentes protocolos en la crioconservación de semen.

- Se concluye que este manual servirá como un instrumento de apoyo para fortalecer cada una de las actividades a realizarse dentro del laboratorio en la organización y operacionalidad de cada práctica.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que el manual debe contener diferentes técnicas, políticas y procedimientos para el desarrollo correcto de las prácticas a realizarse.

- En el manual propuesto debe constar la información que facilite a los alumnos interrelacionar la teoría con la práctica conllevando de esta manera a alcanzar la eficiencia y eficacia en las actividades planificadas dentro del laboratorio

- Se sugiere considerar las medidas necesarias para alcanzar un desarrollo óptimo en cada una de las fases de la crioconservación del semen obteniéndose de esta manera resultados favorables.

BIBLIOGRAFIA

Citas Consultadas

- 1) AUSTIN C.R. BISHOP M.W.H. .- Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B. 149: 241-1958.
- 2) ARRAU J. ROBLERO L. CURY M. .- New observations on the onset and duration of meiotic prophase in golden hamster. J. Anat. 132: 627-633. 1981
- 3) ARRAW J. Curso Internacional Relaciones Maternofetales y Nuevas Tecnicas En Transferencia De Embriones. Valdivia Chile. 1984.
- 4) BARROS C.-Fecundación. Curso Internacional relaciones Materno-Fetales y Nuevas Tecnologías en Transferencia De Embriones. 169-202 1984
- 5) Amann, R.P., Schenbacher, B.D. Physiology of male reproduction. Animal Science 1983; 57: 380-403
- 6) Anel, L., Gerra, C., Alvarez, M., Anel, E., Martinez, A.F., Boixo, C.J., Kaabi, M., Herraiz, P., and Paz, P. Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Theriogenology 2002; 57: 577
- 7) WILFREDO HUANCA L. (2001). Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Vacas Lecheras. Rev. Inv. Vet. Perú; 12(2): 161-163.
- 8) Attia, K.A., Zaki, A.A., Eilts, B.E, Paccamonti, D.L., Hosgood, G., Dietrich, M.A., Horohow, D.W., And Blouin, D.C. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in Theriogenology 2000; 53:1355-1363.
- 9) Axné, E., Linde-Forsberg, G., Einarsson, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of epididymal duct in the domestic cat. Theriogenology 1999; 52: 767-778
- 10) Barrios, DA. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros Post-Mortem. IX Congreso venezolano de Producción e Industria Animal. Valera 2002.

- 11) Bartels, P., Lubbe, K., Killian, I., Friedmann, Y., Van Dyk, G. and Mortimer, D. In vitro maturation and fertilization of Lion (Panteraleo) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by caudaepididymectomy of an immobilized Lion. *Theriogenology* 2000; 53: 325
- 12) Carr, D.W., Acott, T.S. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *BiolReprod.* 1984 May;30(4):913-25.
- 13) Chulavatnatol, M. Motility initiation of quiescent spermatozoa from rat caudal epididymis: effects of pH, viscosity, osmolality and inhibitors. *JournalAndrology.* 1982; 5(4): 425-36.
- 14) Chye Ng, S., Martelli, P., Liow, S.L., Herbert, S. and Oh, S.H. Intracytoplasmic injection of frozen-thawed epididymal spermatozoa in a nonhuman primate model, the Cynomolgus Monkey (*Macacafascicularis*).
- 15) Galina, C.S y ARTHUR G.H (1989) Review of cattle reproduction in the tropics *Anim Breeding Abst* 57: 585-588.

Enlaces Web

- a) <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/conteo-celular-concentraciones-bajas.htm>
22:10-16/10/2013
- b) <http://www.reprobiotec.com/congelvivos.html>
21:00-22/11/2013
- c) <http://www.cryocel.com/cryocelesp/semencongelado/index.html>
7:25-15/12/2013
- d) <http://es.scribd.com/doc/23408590/Manual-de-reproduccion-animal.html>
20:00-22/12/2013
- e) <http://www.3tres3.com/los-expertos-opinan/congelacion-de-semen-en-porcino-historia-y-evolucion-1767.html>
22:00-05/01/2014

ANEXOS

Anexo 1: Ficha De Trabajo

FICHA DE TRABAJO		
AUTOR		TITULO (Libro)
CONTENIDO		
Número de pagina	Fecha en que se Publico	Editorial

Fecha en que se recogió el dato.

El motivo de reunir la información.

Anexo 3. Plan de Renovación de los Equipos

Laboratorio	Propuesta	Requerimiento	Vida Útil	Renovación
Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Universidad Técnica de Cotopaxi (Medicina Veterinaria)	<u>INFRAESTRUCTURA</u>	<u>EQUIPOS</u>		El Mantenimiento de estos equipos deberá ser realizado a los 3 años para verificar el correcto funcionamiento de los mismos, caso contrario si presentan alguna anomalía o mal funcionamiento se solicitara al técnico especialista la revisión de los equipos.
	Adecuar el laboratorio de biotecnología, el mismo que constara del área de equipamiento, la zona sucia, baño y el laboratorio donde se realizara las practicas	· Criology 5500	4 – 6 Años	
		· Estereomicroscopio	6 – 7 Años	
	<u>EQUIPAMIENTO</u>	· Congelador	4 – 6 Años	
	Dotar al laboratorio con los equipos necesarios para la realización de procedimientos académicos y de investigación	· Microscopio de contraste de fases	7 – 8 Años	

Fuente: Directa

Elaborado por: Ivonne Villacis