

	UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER OCAÑA			
	Documento	Código	Fecha	Revisión
FORMATO HOJA DE RESUMEN PARA TRABAJO DE GRADO	F-AC-DBL-007	10-04-2012	A	
Dependencia	Aprobado		Pág.	
DIVISIÓN DE BIBLIOTECA	SUBDIRECTOR ACADEMICO		i(38)	

RESUMEN – TRABAJO DE GRADO

AUTORES	JOSE ALIRIO GALVIS FLOREZ		
FACULTAD	CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE		
PLAN DE ESTUDIOS	ZOOTECNIA		
DIRECTOR	AH-DOC: DANIEL ANTONIO HERNANDEZ VILLAMIZAR		
TÍTULO DE LA TESIS	EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL SEMEN DE CONEJO CRIO-PRESERVADO, UTILIZANDO UN DILUYENTE A BASE LECITINA DE SOYA.		
RESUMEN (70 palabras aproximadamente)			
<p>SE REALIZARON EVALUACIONES DE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL, VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA. EL NIVEL DE INCLUSIÓN DEL 10% MOSTRO LOS MEJORES RESULTADOS EN SEMEN FRESCO Y A 5°C MAS NO PARA CRIO PRESERVACIÓN EN TODAS LA EVALUACIONES. SE CONCLUYE QUE EL NIVEL DEL 10% FAVORECE LA DILUCIÓN Y UTILIZACIÓN DEL SEMEN EN FRESCO O PARA SU CONSERVACIÓN A 5°C.</p>			
CARACTERÍSTICAS			
PÁGINAS: 39	PLANOS:	ILUSTRACIONES:8	CD-ROM:1



**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL SEMEN DE CONEJO CRIO-
PRESERVADO, UTILIZANDO UN DILUYENTE A BASE LECITINA DE SOYA.**

AUTOR:

JOSÉ ALIRIO GALVIS FLÓREZ

**TRABAJO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE
ZOOTECNISTA BAJO LA MODALIDAD DE PASANTÍAS**

DIRECTOR:

ESPECIALISTA, CARLOS ANDRES SEPULVERDA PALLARES

DIRECTOR AH-DOC:

MAGISTER, DANIEL ANTONIO HERNANDEZ VILLAMIZAR

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER OCAÑA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

ZOOTECNIA

OCAÑA, COLOMBIA

MARZO DE 2020

Contenido

Resumen	0
Capítulo 1. Evaluación de la viabilidad del semen de conejo Crio-preservado, utilizando un diluyente a base lecitina de soya	1
1.1 Descripción breve de la empresa	1
1.1.1. Misión.....	2
1.1.2. Visión.	2
1.1.3 Objetivos de la empresa.....	2
1.1.4. Descripción de la estructura organizacional de la dependencia.	4
1.1.5. Descripción de la estructura organizacional.....	4
1.2. Diagnóstico inicial de la dependencia.	4
1.2.1. Planteamiento del problema.	6
1.3. Objetivos de la pasantía.....	7
1.3.1. Objetivo general.	7
1.3.2 Objetivos específico.	7
1.4. Actividades a desarrollar	7
1.5. Cronograma de actividades	8
Capítulo 2. Enfoque referencial.....	10
2.1. Enfoque conceptual	10
2.1.1. Producción cunicola.	10

2.1.2. Cunicultura en Colombia.....	10
2.1.3. Biotecnologías reproductivas.	11
2.1.4. Evaluación del macho.....	13
2.1.5. Características generales del semen.	13
2.1.6. Evaluación de la calidad espermática.....	14
2.2. Enfoque legal.....	16
2.2.1. Resolución 02820 11/10/2001.....	16
Capítulo 3. Informe de Cumplimiento de Trabajo	17
3.1. Descripción del ensayo.....	17
3.2. Niveles De Inclusión	18
3.3. Preparación de diluyente	18
3.4. Colecta de semen.....	18
3.5. Muestras y procesamiento	18
3.6. Resultados y discusión	21
3.7. Actividades realizadas durante la pasantía	23
Capítulo 4. Diagnostico Final.....	24
Capítulo 5. Conclusiones.....	25
Capítulo 6. Recomendaciones	26
Referencias	27

Lista De Tablas

Tabla 1 Matriz DOFA	5
Tabla 2 Descripción de las actividades específicas acordes a los objetivos planteados.	7
Tabla 3 Cronograma de actividades	8
Tabla 4 Escala de evaluación de movilidad masal espermática	14
Tabla 5 Niveles de inclusión del diluyente.....	18
Tabla 6 Motilidad vs Nivel de inclusión. Individuo 1	21
Tabla 7 Motilidad vs Nivel de inclusión. Individuo 2.....	22

Lista De Figuras

Figura 1. Tinción Eosina-nigrosina Test (Mellisho, 2010)	15
Figura 2. Test hipo osmótico (Mellisho, 2010).	16
Figura 3a. macho Belier (individuo de la izquierda), 3b. macho Nueva Zelanda (individuo de la derecha)	17
Figura 4. 4a Viales en baño de maría, 4b microscopio utilizado, 4c micro pipetas.	19
Figura 5. 5a porta y cubre objetos, 5b campo en 4x, 5c campo en 20x.....	20
Figura 6. Nivel de inclusión del diluyente individuo 1 (1.9 cc agua y 1 cc diluyente, 2.8cc agua y 2 cc diluyente, 3.7 cc agua y 3 cc diluyente).....	21
Figura 7. Nivel de inclusión del diluyente individuo 2 (1.9 cc agua y 1 cc diluyente, 2.8cc agua y 2 cc diluyente, 3.7 cc agua y 3 cc diluyente).....	22
Figura 8. Actividades de apoyo al laboratorio de reproducción.....	23

Introducción

A lo largo de los años se ha tenido clara la implementación de nuevas tecnologías buscando el mejoramiento de los sistemas de producción zootécnicos, así como también la expansión de genética de buena calidad buscando mantener siempre unos pilares reproductivos óptimos, para que las razas sean productivas en el ambiente de producción que tengamos igualmente tratando de tener todo lo conveniente, siendo esto la búsqueda de genética en otros lugares ajenos o lejanos al de nuestro sitio de producción; efecto que generó la implementación de técnicas en la parte reproductiva que con la intervención de la mano humana se puedan realizar procesos en tiempos establecidos y así mismo con la genética que se quiere lograr.

Siendo la reproducción uno de los factores más influyentes al momento de querer una genética determinada, se deben visualizar los procesos realizados en este campo en la búsqueda de mejoramiento genético; siendo estas técnicas como la inseminación artificial y la sincronización de celos para poder controlar los tiempos de montas y posibles fechas de partos. Basados en esto podemos también hablar del manejo de semen crio-preservado o congelado, el cual es almacenado en forma de pajillas para poder ser transportado y luego depositado en la hembra que hemos determinado para esto, para los conejos es un proceso el cual se ha venido buscando en granjas de una alta densidad de hembras y en las cuales a su vez la presencia de varios machos puede ser una pérdida económica, por lo cual se cuenta solo con uno para detectar celos y pajillas para inseminar a estar conejos con celo o en su defecto las que hayan sido sincronizadas. El presente trabajo se evaluará la integridad y viabilidad que el semen crio-preservado de conejos de diferentes razas, con el fin de evaluar que tanto porcentaje eficiencia se puede tener al momento de realizar una inseminación con una pajilla conservada por el promedio de unos 2 a 4 meses.

Resumen

La crio preservación de semen es una técnica reproductiva muy importante. La evaluación del semen y el uso de crio protectores ha venido evolucionando con el pasar de los años. Sin embargo el uso de crio protectores comerciales incrementa los costos de producción. El objetivo de este fue evaluar de la viabilidad del semen de conejo Crio-preservado, utilizando un diluyente a base lecitina de soya; para ello se colecto el semen de dos conejos de las razas Belier y Nueva Zelanda; las muestras tomadas fueron divididas en tubos de Eppendorf para posteriormente ser mezcladas con lecitina de soya en tres niveles de inclusión (10, 20 y 30%). Se realizaron evaluaciones de la motilidad individual, viabilidad espermática e integridad de la membrana plasmática. El nivel de inclusión del 10% mostro los mejores resultados en semen fresco y a 5°C mas no para crio preservación en todas la evaluaciones. Se concluye que el nivel del 10% favorece la dilución y utilización del semen en fresco o para su conservación a 5°C.

Palabra claves: crio preservación, lecitina de soya, conejos.

Capítulo 1. Evaluación de la viabilidad del semen de conejo Crio-preservado, utilizando un diluyente a base lecitina de soya.

1.1 Descripción breve de la empresa

Según Acuerdo No. 003 del 18 de Julio de 1974, por parte del Consejo Superior de la Universidad Francisco de Paula Santander Cúcuta, se crea la Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, como máxima expresión cultural y patrimonio de la región; como una entidad de carácter oficial seccional, con autonomía administrativa y patrimonio independiente, adscrito al Ministerio de Educación Nacional.

Según la Universidad Francisco de Paula Santander (1994) en el Acuerdo N° 029 expone:

La Universidad Francisco de Paula Santander Seccional Ocaña, es una dependencia Académico Administrativa adscrita a la Rectoría y enmarcada en los mismos principios objetivos y campos de acción de la Universidad, con patrimonio independiente, rentas propias, autonomía administrativa y financiera pudiendo elaborar y ejecutar su presupuesto. Sus fines, principios y objetivos son los que la universidad cumple según lo establece la Ley 30 del 28 de diciembre de 1992 y el Estatuto General de la Universidad, establecido por el Acuerdo No.091 de diciembre de 1993 emanado del Consejo Superior Universitario. (Art. 1)

1.1.1. Misión. La Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, institución pública de educación superior, es una comunidad de aprendizaje y autoevaluación en mejoramiento continuo, comprometida con la formación de profesionales idóneos en las áreas del conocimiento, a través de estrategias pedagógicas innovadoras y el uso de las tecnologías; contribuyendo al desarrollo nacional e internacional con pertinencia y responsabilidad social (UFPSO, 2016).

1.1.2. Visión. La Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña para el 2019, será reconocida por su excelencia académica, cobertura y calidad, a través de la investigación como eje transversal de la formación y el uso permanente de plataformas de aprendizaje; soportada mediante su capacidad de gestión, la sostenibilidad institucional, el bienestar de su comunidad académica, el desarrollo físico y tecnológico, la innovación y la generación de conocimiento, bajo un marco de responsabilidad social y ambiental hacia la proyección nacional e internacional (UFPSO, 2016)

1.1.3 Objetivos de la empresa.

1.1.3.1. Investigación y formación académica. La investigación como eje transversal de la formación se desarrolla a través de la incorporación e implementación de las TIC en los procesos académicos, la cualificación docente, la calidad y pertinencia de la oferta, la cobertura y el desarrollo estudiantil como soporte integral del currículo, de la producción científica y la generación de conocimiento, hacia la consolidación de la Universidad como institución de investigación (UFPSO, 2016).

1.1.3.2. Desarrollo físico y tecnológico. Fortalecimiento de la gestión tecnológica y las comunicaciones, modernización de los recursos y adecuación de espacios físicos suficientes y pertinentes para el desarrollo de las funciones sustantivas y el crecimiento institucional (UFPSO, 2016).

1.1.3.3. Impacto y proyección social. Desarrollo de las capacidades institucionales promoviendo impactos positivos a la región, el medio ambiente y la comunidad, mediante la creación de alianzas estratégicas, ejecución de proyectos pertinentes, aumento de cobertura en actividades de extensión y el compromiso con la responsabilidad social (UFPSO, 2016).

1.1.3.4. Visibilidad nacional e internacional. Integración, transformación y fortalecimiento en las funciones de investigación, docencia y extensión para su articulación en un ambiente globalizado de excelencia y competitividad, tomando como referencia las tendencias, el estado del arte de la disciplina o profesión y los criterios de calidad reconocidos por la comunidad académica nacional e internacional (UFPSO, 2016).

1.1.3.5. Bienestar institucional. Generación de programas para la formación integral, el desarrollo humano y el acompañamiento institucional que permitan el mejoramiento de las condiciones de vida de la comunidad universitaria con servicios que sean suficientes, adecuados y accesibles, que respondan a la política integral de bienestar universitario definida por la institución (UFPSO, 2016).

1.1.3.6. Sostenibilidad administrativa y financiera. Implementación y mantenimiento de procesos eficientes y eficaces en la planeación, ejecución y evaluación administrativa y financiera; abordando estándares de alta calidad y mejoramiento continuo en todos los niveles de la organización; generando espacios de participación, transparencia, eficiencia y control de la gestión (UFPSO, 2016)

1.1.4. Descripción de la estructura organizacional de la dependencia. La Universidad Francisco de Paula Santander Seccional Ocaña actualmente tiene la siguiente estructura orgánica.

1.1.5. Descripción de la estructura organizacional. La Granja Experimental UFPSO se ubica a la margen derecha del río Algodonal, dentro del campus universitario, a una altura de 1150 msnm, con una temperatura promedio de 23 °C, una humedad relativa del 70% y una extensión de 135 ha; también cuenta con el Centro de Investigación La Troya, que se encuentra ubicado en el corregimiento de Los Ángeles (Río de Oro – Cesar), dedicada al estudio de ganado de las razas Romosinuano y Costeño con Cuernos. Dentro de la granja experimental se encuentra el Laboratorio de Reproducción Animal bajo la coordinación Carlos Andrés Sepúlveda Pallares. El laboratorio tiene por objeto brindar todos los elementos para el correcto desarrollo de las asignaturas y prácticas de reproducción animal y evaluación reproductiva que cursan los alumnos para cumplir el ciclo profesional de la carrera de Zootecnia.

1.2. Diagnóstico inicial de la dependencia.

El laboratorio de reproducción animal de la Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña, cuenta con instalaciones de excelente calidad, también goza de equipos como son: Electro-eyaculador, ecógrafo portátil, microscopios, centrifugadora, vaginas artificiales, baño de maría, plancha de calentamiento, bomba de aspiración folicular; con que debe contar dicho laboratorio para realizar las prácticas y la observación constante del estado reproductivo de los animales de la granja experimental y parcela la Troya, También, cuenta con personal capacitado que es el encargado de llevar a cabo y supervisar todo tipo de proceso relacionado con la reproducción animal de la UFPSO.

Por otro lado, el laboratorio está a disposición permanente para el desarrollo de actividades académicas, principalmente de materias relacionadas a la carrera de Zootecnia, y se permite participar en la extensión rural en la zona de influencia de la Universidad.

Tabla 1
Matriz DOFA

	DEBILIDADES	FORTALEZAS
	* Falta de métodos para la crio-preservación de semen de conejo.	* Personal capacitado para dirigir y ejecutar cualquier tipo de procedimiento reproductivo.
	* Demoras para la obtención de materiales	*Equipos de excelente calidad para el desarrollo de actividades reproductivas. *Control de registros reproductivos. *Disponibilidad de recurso humano con aporte profesional (estudiantes).
OPORTUNIDADES	DO	FO
* Extensión rural en zonas de influencia de la UFPSO	Optimizar el apoyo del estado para mejor adquisición de materiales y apoyar procesos de las actividades reproductivas.	Aprovechamiento del recurso humano con que cuenta la universidad para brindar información y asesorías a diferentes asociaciones campesinas
* Vías de acceso en buen estado	los materiales en el tiempo adecuado facilitando así el desarrollo de todo tipo de actividades reproductivas	
* Reconocimiento a nivel regional		
*Apoyo permanente por parte del estado	DA	
*Mejoramiento genético de los animales de la granja	La implementación de crio-preservación de semen de conejo, permitirá las prácticas de inseminación artificial, así como el mejoramiento genético y la expansión de una buena genética como método de extensión.	

Tabla 1
Matriz DOFA (continuación)

AMENAZAS	FA
* El rápido avance tecnológico de los equipos y técnicas utilizados para la reproducción animal.	Para brindar los adecuados conocimientos a estudiantes de la universidad se debe ir al par de los
* Falta de información sobre técnicas reproductivas.	avances tecnológicos con relación a la reproducción animal

Nota: Análisis de la dependencia. Fuente: Autor.

1.2.1. Planteamiento del problema. La búsqueda de nuevas razas o genéticas anteriormente era difícil ya que solamente se podría hacer comprando el macho que tuviera aquel gen que quisiéramos transmitir o en su defecto que haya mostrado en su progenie una calidad alta de producción según sea su línea (carne, leche, pelo, lana, etc.) siendo así una forma algo difícil de expandir esta genética, ya que muchas veces son animales de otro lugares del país donde tenemos nuestras propias zonas de producción y esto genera costos de traslado, sanidad, etc. Es por esto que en la actualidad y gracias a las nuevas tecnologías reproductivas y de conservación de genética (semen, embriones, folículos) ha logrado que el transporte de estos mismos sea un poco más económico, seguro, bajo parámetros de más bioseguridad y sanidad, así mismo como también se tiene información de las razas y padres de cada uno de los animales involucrados en un proceso, buscando así prevenir problemas de consanguinidad presentados en muchas especies, que por no saber la descendencia de muchos de los animales en su producción, generar cruces que traen problemas y pérdidas económicas, siendo esto uno de los puntos que han generado consanguinidad en el proyecto cunicola de la Universidad.

1.3. Objetivos de la pasantía

1.3.1. Objetivo general.

Evaluar de la viabilidad del semen de conejo Crio-preservado, utilizando un diluyente a base lecitina de soya.

1.3.2 Objetivos específico.

Evaluar la motilidad individual del semen de conejo crio-preservado.

Determinar la viabilidad del semen crio-preservado.

Evaluación de la integridad de la membrana (Hots)

Apoyar las actividades reproductivas de la granja experimental y parcela la Troya de la UFPSO.

1.4. Actividades a desarrollar

Tabla 2

Descripción de las actividades específicas acordes a los objetivos planteados.

Objetivo general	Objetivos específicos	Actividades para desarrollar en la empresa para hacer posible el cumplimiento de los objetivos
Evaluar de la viabilidad del semen de conejo Crio-preservado, utilizando un diluyente a base lecitina de soya.	Evaluar de la viabilidad del semen de conejo Crio-preservado, utilizando un diluyente a base lecitina de soya.	Realizar sincronización de las conejas para tener celos
	Determinar la viabilidad del semen crio-preservado	Realizar colectas de semen cunícola. Evaluar macroscópica y microscópicamente (motilidad, tinción) las muestras de semen colectadas.

Tabla 2

Descripción de las actividades específicas acordes a los objetivos planteados. (continuación)

Evaluar de la integridad de la membrana (Hots)	Diluir las muestras colectadas para el proceso de empaque de pajillas.
Apoyar las actividades reproductivas de la granja experimental y parcela la troya de la UFPSO	Realizar proceso de estabilización y crio-preservación de las pajillas. Realizar evaluación de motilidad individual, tinción y prueba de host a las muestras post descongelación.

Nota: Muestra el objetivo general y los objetivos específicos, así mismo las actividades a realizar para dar cumplimiento a estos mismos. Fuente: Autor.

1.5. Cronograma de actividades

Tabla 3

Cronograma de actividades

Actividades	Periodo	SEMANAS															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Realizar sincronización de las conejas para tener celos			X				X				X					X	
Realizar colectas de semen cunícola.			X				X				X					X	
Evaluar macroscópica y microscópicamente (motilidad, tinción) las muestras de semen colectadas.			X				X				X					X	
Diluir las muestras colectadas para el proceso de empaque de pajillas.			X				X				X					X	
Realizar proceso de estabilización y crio-preservación de las pajillas.			X				X				X					X	

Capítulo 2. Enfoque referencial

2.1. Enfoque conceptual

2.1.1. Producción cunicola. Rondando los 925 millones de cabezas o más, en los cuales se destacan Asia (56,7%) y América del Sur (30%), siendo esto una muestra del crecimiento de la producción debido a la alta demanda de consumo de proteína animal, siendo el conejo la especie más rápida y fácil de producir (Álvarez de Toledo, 2014).

2.1.2. Cunicultura en Colombia. La producción cunicola tuvo los inicios en 1960 con un programa departamental principalmente en Antioquia, Valle y Cundinamarca con el fin de tener una entrada menor para los campesinos así como también parte de su alimentación, no teniendo buen futuro este proyecto, por lo que en la década del 65 se importaron las razas Nueva Zelanda (blanca, roja y negra) y Californiana para poder mejorar las características productivas y de esta forma poder cumplir el propósito de evolución con los campesinos (Silva, 2016)

El mercado en Colombia se encuentra en una fase inicial o de acostumbramiento ya que el rendimiento en canal es poco y el subproducto de este mismo (piel) aún no tiene una industria especializada en su manejo (Cajiao, 2013). En la actualidad la producción cunicola ha empezado a surgir como apoyo a proyectos de emprendimiento de mejoras en el campo, pero sin tener un reporte oficial de la población cunicola actual, ya que dentro de los censos anuales realizados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) no se encuentran reportes de población cunicola.

2.1.3. Biotecnologías reproductivas. Están comprendidas de biotécnicas enfocadas en el aumento de la eficiencia reproductiva de una unidad productiva (bovina, porcina, cunicola, etc.) conservando en muchas ocasiones especies en peligro de extinción; incrementando la multiplicación y transporte de material genético, con la posibilidad de ser usado a futuro (González & González, 2005).

2.1.3.1. Sincronización e inducción de la ovulación. Mecanismo utilizado para controlar el ciclo estral de las hembras, sirve para establecer método eficaces concepción (preñez) siendo así la utilidad de este método para tener animales receptores en protocolos de transferencia de embriones, así como también en el uso de súper-ovulación; de esta forma se utilizan diferentes método buscando tener al mismo tiempo una “franja” o grupo de hembras en celo al tiempo, usando así varios métodos como son el uso de hormonas, o el aislamiento del macho y la presencia del mismo un tiempo después (González & González, 2005).

En conejas es fácilmente utilizado, con bajos costos de producción el cambio de jaulas de las conejas aproximadamente 8 horas antes de realizarse la monta natural (M.N) o inseminación artificial (I.A), teniendo este método una alta respuesta a la receptibilidad de la hembra (Rodríguez De Lara R. y Fallas, 1993).

2.1.3.2. Recolecta de ovocitos (súper-ovulación). Practica que nos permite la recolección de ovocitos inmaduros extraídos del ovario directamente y los cuales son usados en procesos de evaluación de estos mismos para ver la calidad que ellos pueden tener así como para programas de fertilización in vitro; lo que nos permite tener una buena genética de una hembra (donadora) al mismo (González & González, 2005).

2.1.3.3. Inseminación artificial. Es una de las herramientas biotecnológicas reproductivamente más usada, siendo esta una solución a muchos problemas sanitarios que se obtenían al momento de usar montas directas y de igual forma es más eficaz para realizar una selección y agilizar el proceso de mejoramiento genético realizado por selección de los animales, de tal forma se pueden realizar pruebas de la calidad del semen que sería una ayuda adicional al momento de buscar una buena calidad de macho (Battaglini, 1982).

2.1.3.4. Crio-preservación. Método que tiene como principio bajar la temperatura de la muestra (semen) para bajar la actividad metabólica para así evitar el desgaste de la misma, adyacente a esto se mezclan con sustancias “crio-protectoras” las que son especializadas para ayudar a proteger la muestra de las bajas temperaturas (-196°C) y así mismo almacenadas a esta temperatura pueden ser conservadas por mucho tiempo (González & González, 2005).

2.1.3.4.1. Crio-protectores.

Lecitina es un término usado para sustancias grasas (lípidos) de colores entre el amarillo y marrones, que constituyen tejidos animales y vegetales; la componen ácidos fosfóricos y grasos y gracias a su aporte calórico y energético ha demostrado utilidad en el tratamiento de lesiones cerebrales y cardiovasculares, todos estos efectos y beneficios lo han puesto en el ojo de los ensayo biotecnológicos (Calviño, Sánchez, & García, 2017).

La composición química de la lecitina de soya es principalmente aminoácidos esenciales para la elaboración de proteínas en el cuerpo, así como hidratos de carbono, lípidos, fibras, saponósidos, vitamina y minerales, así como algunas enzimas, ácido fitico e isoflavonas, siendo prácticamente insoluble en agua y aceites vegetales (es una característica de alto valor al momento de pensarse usar como diluyente y crio-preservador de semen), pero es posible su hidratación lo que da una gran característica para formar bicapas lipídicas o micelas que

dependen del tipo de hidratación o temperatura (Calviño et al., 2017). La evaluación del semen se realiza de forma macroscópica y microscópica revisando así el volumen de eyaculado, el color, olor, espermatozoides vivos y motilidad individual, siendo estos dos últimos las comparaciones utilizadas para evaluación pre y post dilución, debido a que son marcadores reconocibles al momento de mirar al microscopio (Sánchez-Rodríguez, Lorenzo, & Rebollar, 2015)

2.1.4. Evaluación del macho. Es un proceso por el cual se va a regir la calidad de macho que se quiere tener y mediante la cual se pueden tomar decisiones de cuál es la edad optima o cual es la mejor calidad de macho según la edad, peso, calidad de semen y así tener una mejor selección con el transcurso del tiempo en la explotación cunicola que tengamos, es así como en este estudio se determinó que la edad óptima para la reproducción de un macho es de los 10 a 18 meses teniendo en cuenta la evaluación de la calidad seminal y lívido sexual del animal (García, Andrés, Caselles, & Lavara, 2004).

Las primera eyaculaciones de un conejo esta alrededor de los 4 meses ya que es donde se empieza la madurez sexual y el relejo del lívido sexual, y teniendo una viabilidad y alta fertilidad después de siete meses con un peso promedio de 3,8 kg (Vicente. J, Lavara. R, Viudes de Castro. M, 2019)

2.1.5. Características generales del semen. El semen está compuesto por un acumulado de líquidos volumétricos excretados por las glándulas accesorias del macho y espermatozoides los cuales son alargados con una diferenciación de la cabeza y el cuerpo; la cabeza es la que contiene el ADN que es la información que este aporta al momento de la fecundación, la pieza media que está envuelta en una hélice de mitocondrias que le dan la energía necesaria para el

movimiento y su parte final del cuerpo la cola que es necesaria para sus movimientos progresivos (Enciso Lorences, 2009)

2.1.6. Evaluación de la calidad espermática.

2.1.6.1. Volumen y concentración. Se verifica sobre un tubo graduado normalmente, de igual forma se maneja un promedio de 0,1 a 1,4 ml en los conejos; la concentración es evaluada en cámara de new Baguer, siendo en esta última determina la concentración por ml eyaculado y manejando un promedio de 280 hasta 1050 millones de espermatozoides por ml (Ferrian, 2007).

2.1.6.2. Movilidad masal. Es la velocidad con que se mueven en conjunto todos los espermatozoides mostrando así una serie de pequeños remolinos; se evalúan en una escala de 1 a 5, siendo 1 lo pésimo y 5 lo óptimo como se muestra en la tabla 1.

Tabla 4
Escala de evaluación de movilidad masal espermática

Grado	Clave	Descripción
5	Muy Bueno	Denso, con hondas moviéndose rápido, no se observan espermatozoides individuales, >90% de espermatozoides activos.
4	Bueno	Movimiento vigoroso, hondas menos móviles que en grado 5, un promedio de 70% a 85 % de espermatozoides activos.
3	Regular	Bajo movimiento de hondas, se pueden observar espermatozoides individuales, promedio de 45% a 65 % de espermatozoides activos.
2	Pobre	No hay presencia de hondas, se observan algún movimiento de espermatozoides, promedio de 20% a 40 % de espermatozoides activos.
1	Muy Pobre	10% promedio de espermatozoides activos, pero con movimientos estacionarios.

Nota: Modificado de (Ferrian, 2007).

2.1.6.3. Movilidad individual. Es la relación de la cantidad de espermatozoides móviles y a su vez el movimiento progresivo de cada uno de estos; por ello se evalúan el movimiento rectilíneo y progresivo hacia adelante, dando en este caso un porcentaje de qué cantidad se mueven de esta forma en un campo de visión o tomando como referencia varios, el porcentaje se maneja de 0% al 100% (Ferrian, 2007).

2.1.6.4 Test de Eosina-Nigrosina. La integridad de la membrana espermática es de gran importancia ya que es un indicativo de que tan funcional está el espermatozoide, para esto es usado el test de Eosina-Nigrosina que nos permite identificar la cantidad de espermatozoides vivos y muertos, siendo los vivos aquellos que no toman ningún color y los muertos o los que presentan alguna alteración aquellos que tienen una leve coloración o tinción entre rosado y morado (Figura 1) (Mellisho, 2010).

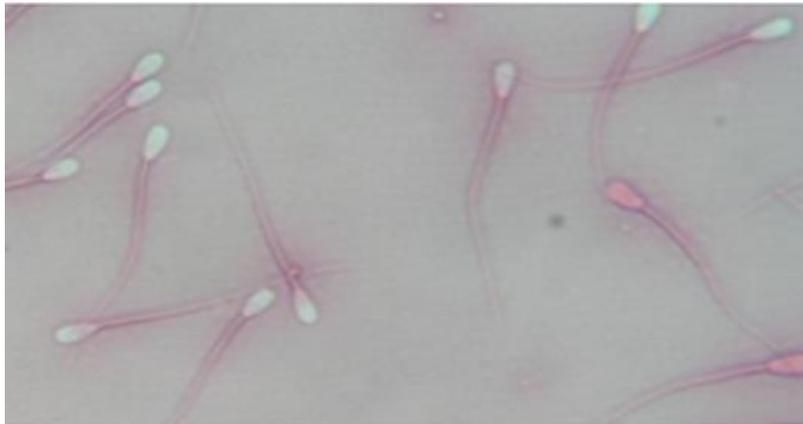


Figura 1. Tinción Eosina-nigrosina Test (Mellisho, 2010)

2.1.6.5. Test hipo osmótico. La prueba de endosmosis (test, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica menor que la fisiológica, lo que causa un ingreso de agua en la célula con el fin de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta reacción se produzca, la membrana plasmática debe estar intacta con el fin de poder generar un intercambio osmótico sin ningún problema logrando así que no se encuentre

ningún cambio en la estructura de la célula en este caso el espermatozoide (*Figura 2*) (Mellisho, 2010).



Figura 2. Test hipo osmótico (Mellisho, 2010).

2.2. Enfoque legal

2.2.1. Resolución 02820 11/10/2001. “Por la cual se dictan disposiciones para el Control Técnico de la Producción, Importación y Comercialización del Material Seminal y Embriones.

El Gerente General del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, en uso de sus facultades legales y en especial de las que le confieren los Decretos números 2141 de 1992, 2645 de 1993, 1840 de 1994, 1454 de 2001, y considerando: Que corresponde al Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, ejercer el control técnico de los Insumos Agropecuarios; Que el material seminal y los embriones son insumos pecuarios de origen biológico, utilizados para promover la producción pecuaria; que toda persona natural o jurídica que se dedique a la producción, importación, control de calidad y comercialización de Material Seminal y Embriones, deberá registrarse en el ICA y cumplir las normas contenidas en la legislación vigente; que es necesario establecer las normas a las cuales se debe sujetar toda persona natural o jurídica que se dedique a las actividades mencionadas en el considerando anterior” (ICA, 2001).

Capítulo 3. Informe de Cumplimiento de Trabajo

3.1. Descripción del ensayo

Se realizó en el proyecto cunícola de la granja experimental de la Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña (UFPSO), la cual tiene una altitud de 1202 m.s.n.m. una temperatura promedio de 22°C; con una ubicación satelital 8°14'19"N 73°19'13"W (Google, 2018). Este ensayo se realizó durante el segundo semestre académico del año 2019. La realización tuvo como materiales de uso dos machos cunícolas: individuo 1 (*Figura 3a*), raza Belier con un peso de 3.8 kg y una edad de 14 meses, el individuo 2 (*Figura 3b*), raza Nueva Zelanda con un peso una condición corporal entre 3 a 3.5 en una escala de 1 a 5. Dichos machos están acostumbrados previamente a la recolección de muestras seminales por medio de vagina artificial específica para la esta especie.



Figura 3a. macho Belier (individuo de la izquierda), 3b. macho Nueva Zelanda (individuo de la derecha)

El proceso a seguir para el ensayo fue probar tres niveles de inclusión del diluyente comercial AndroMed® (Minitube, 2018) los cuales se evaluarán en cuál de estos se tiene mejor respuesta y más conservación al momento de congelar. Estos niveles de inclusión serán el 10%, 20% y 30% de la solución final. La preparación de estos niveles se explica a continuación.

3.2. Niveles De Inclusión

Tabla 5
Niveles de inclusión del diluyente

Volumen ml	Agua	Diluyente
Nivel	(ml)	
1	9	1
2	8	2
3	7	3

3.3. Preparación de diluyente

La preparación del diluyente se realizó en tubos de ensayo graduados adicionando agua destilada según cada nivel de inclusión a una temperatura de 37°C, luego se calentó el diluyente a 35°C según la comercial (Minitube, 2018) posteriormente se midió con una pipeta graduada cada uno de los niveles de inclusión, y se adicionaron a los tubos de cada nivel 1, 2, y 3; se sellaron herméticamente y se estabilizaron cinco minutos en baño de maría.

3.4. Colecta de semen

Para este proceso se utiliza la ayuda de las conejas que previamente son inducidas en celo, o en algunas ocasiones conejas que simplemente se queden quietas al momento de ver la presencia del macho, ya que por adaptación los machos están con un lívido alto e igualmente tratan de montar por la quietud de una hembra. Seguido a la colecta de la muestra se transfiere a un vial graduado.

3.5. Muestras y procesamiento

El eyaculado de cada macho luego de ser depositado en viales (tubos de Eppendorf) graduados para visualizar el volumen eyaculado luego de esto es colocado en el baño maría a 37°C (*Figura 4a*). Se toman pequeñas muestras para evaluar la motilidad masal e individual y ser

revisadas en el microscopio de contraste (*Figura 4b*) las cuales son depositadas con una micropipeta graduada (*Figura 4c*) en un porta objetos y ser cubiertas con un cubre objetos (*Figura 5a*); evaluando en 4x y 20x (*Figura 5 b y c*) para determinar los movimientos progresivos encontrados en los espermatozoides, así como los movimientos en conjunto de todos ellos (Mellisho, 2010). De la muestra de semen puro también se toman 5 μ l a la cual se le adicionan 5 μ l de eosina-nigrosina la cual dará de viables (vivos) e inviables (muertos) que puede presentar la muestra (Mellisho, 2010).



Figura 4. 4a Viales en baño de maría, 4b microscopio utilizado, 4c micro pipetas.

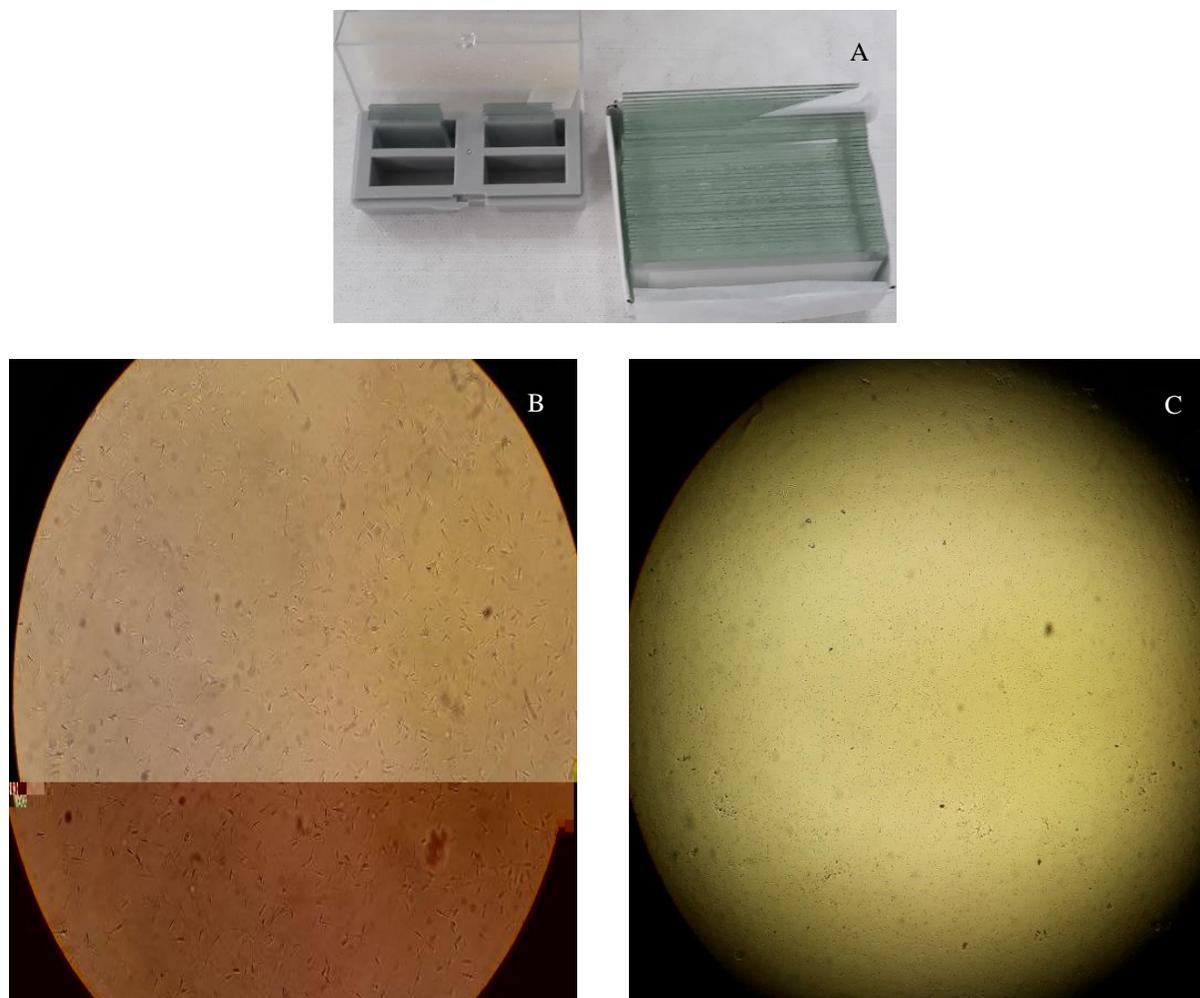


Figura 5. 5a porta y cubre objetos, 5b campo en 4x, 5c campo en 20x.

Concretos los datos anteriores, se procede a realizar la dilución de las muestras en cada uno de los niveles de inclusión, para así realizar el empaque de las pajillas, y luego determinar una curva de congelación en la congeladora de células que se encuentra como equipo de apoyo en el laboratorio.

Posterior al proceso de congelación, se dejan las muestras en nitrógeno líquido por un promedio de diez minutos después de los cuales se descongelan las pajillas y son divididas en muestra para volver a evaluar las pruebas que se realizaron previo la congelación. Adicionando el test hipo osmótico (HOST) que evalúa la integridad de la membrana espermática; esta prueba

e realizó diluyendo 5 μ l de la muestra de semen (pajilla descongelada) en 45 μ l de agua destilada y luego siendo incubada por 5 minutos a 37°C (Mellisho, 2010).

3.6. Resultados y discusión

Los 2 conejos utilizados respondieron al proceso de colecta de semen.

Tabla 6
Motilidad vs Nivel de inclusión. Individuo 1

Tiempo	Fresca (Recién colectada)			5°C			Post Descongelación		
Muestras	\bar{X}^*	C.V**	D.E***	\bar{X}	C.V.	D.E	\bar{X}	C.V	D.E
	(%)								
Nivel 1	86,67	0,07	6,06	78,33	0,07	5,16	5,83	1	5,85
Nivel 2	81,67	0,03	2,58	45,83	0,13	0,19	1,67	1,55	2,58
Nivel 3	60,83	0,06	3,76	39,17	0,19	7,36	1,67	1,55	2,58

Nota: * Promedio, ** coeficiente de variación, *** desviación estándar.

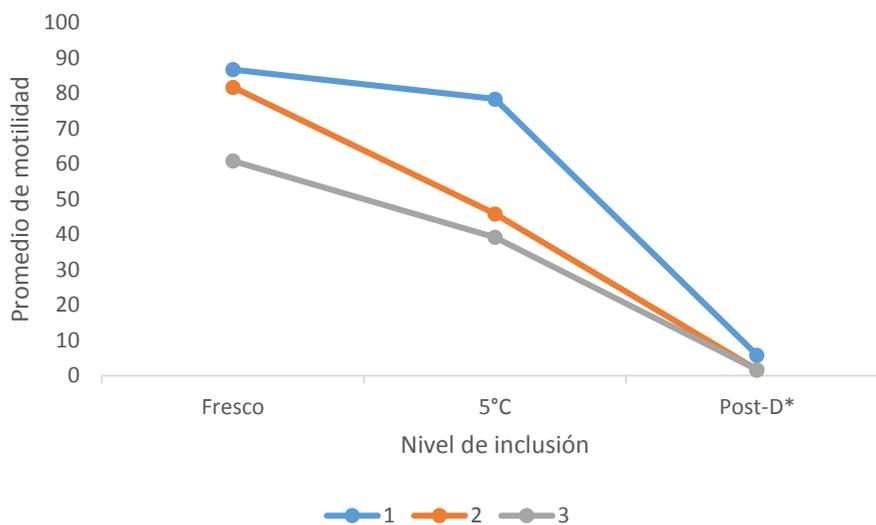


Figura 6. Nivel de inclusión del diluyente individuo 1 (1.9 cc agua y 1 cc diluyente, 2.8cc agua y 2 cc diluyente, 3.7 cc agua y 3 cc diluyente)

Tabla 7
Motilidad vs Nivel de inclusión. Individuo 2

Tiempo	Fresca (Recién colectada)			5°C			Post Descongelación		
Muestras	\bar{X}^*	C.V.**	D.E***	\bar{X}	C.V.	D.E	\bar{X}	C.V	D.E
	(%)								
Nivel 1	80,83	0,06	4,92	73,33	0,08	6,06	5	0,89	4,47
Nivel 2	73,33	0,04	4,92	43,33	0,19	0,16	1,67	1,55	2,58
Nivel 3	55,83	0,07	3,76	38,33	0,16	6,06	3,33	1,22	4,08

Nota: * Promedio, ** coeficiente de variación, *** desviación estándar.

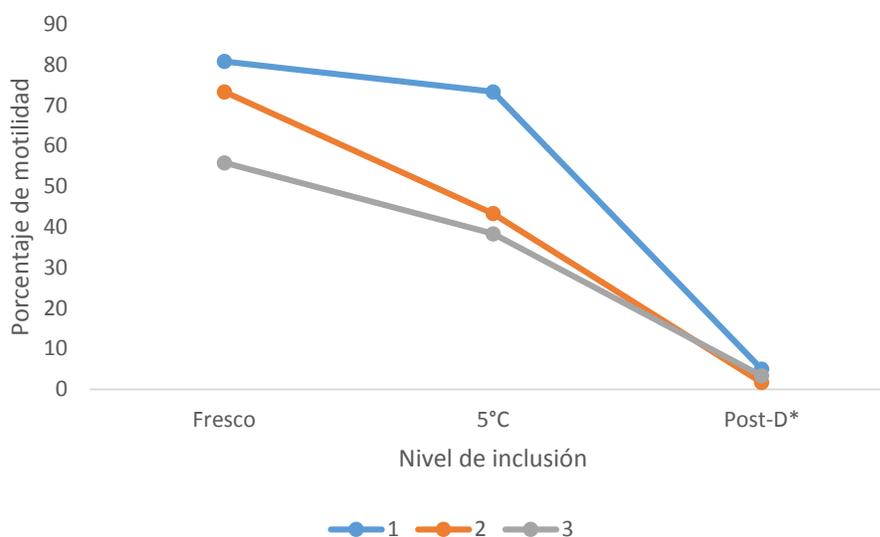


Figura 7. Nivel de inclusión del diluyente individuo 2 (1.9 cc agua y 1 cc diluyente, 2.8cc agua y 2 cc diluyente, 3.7 cc agua y 3 cc diluyente)

Los resultados reportados por Rosato, Rebollar & Iaffaldano (2006) evidencian una diferencia significativa entre los tres tipos de diluyentes comerciales usados en estas pruebas, de los cuales dos eran específicos para conejos y uno diluyente para conservar semen de cerdo, en comparación con los datos obtenidos en el presente estudio donde los diluyentes con base en lecitina de soya funcionaron en fresco, no así a 5°C y pos congelación; por otro lado, no se encontraron diferencias en la motilidad y viabilidad espermática al usar agua de coco como diluyente (Trejo, Meza, Antonio, Cotera, & Antonio-Cisneros, 2013) siendo conservado a 4°C en

un lazo de tiempo, en contraste con el presente estudio donde el nivel de inclusión 1 fue efectivo para la motilidad espermática conservando a 5°C comparando los reportes de Rosero Peñaherrera, Núñez-Torres, & Lozada-Salcedo (2018) el agua de coco tiene mejores valores de motilidad y viabilidad sobre la leche descremada y el aloe vera + yema de huevo.

3.7. Actividades realizadas durante la pasantía

El desarrollo de actividades conveniente a la dependencia asignada se desarrolló en base a todo lo estipulado por el coordinador del laboratorio Esp. Carlos Andrés Sepúlveda Pallares; con el cual se programaban actividades de evaluación reproductiva en cada uno de los proyectos según fuera la necesidad, de igual forma todo lo conveniente con la parte reproductiva (inseminaciones, sincronizaciones, ultrasonografías, etc.) las cuales se hacían enfocadas a cumplir con la función del laboratorio así como el apoyo a la academia de las materias reproducción animal y evaluación reproductiva; adicional a esto se hicieron algunos acompañamientos a las visitas realizadas por entidades ajenas a la universidad y de esta forma mostrar todos los procesos llevados a cabo por parte del laboratorio de reproducción animal.

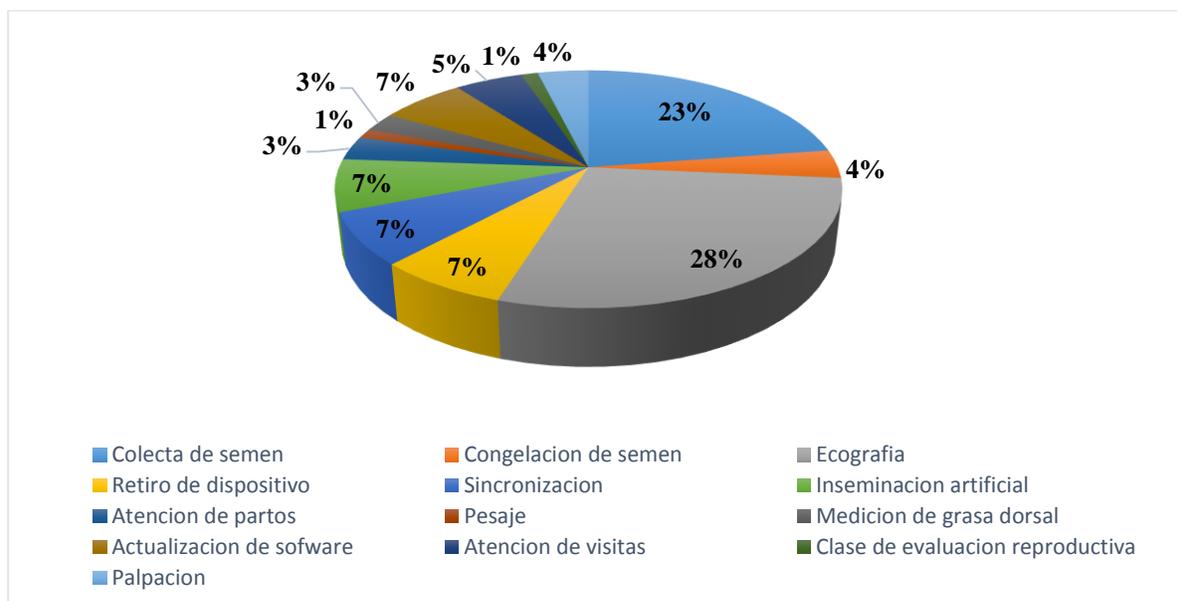


Figura 8. Actividades de apoyo al laboratorio de reproducción

Capítulo 4. Diagnostico Final

Para el semestre académico 2019-II comprendido entre 12 de agosto y 30 de noviembre, se realizaron las actividades de prácticas profesionales como modalidad de pasantías en el laboratorio de diagnóstico reproductivo de la granja experimental de la Universidad Francisco de Paula Santander seccional Ocaña, siguiendo un plan de trabajo programado con anterioridad que incluyo actividades como: ecografías, palpaciones, colectas de semen, etc. en los diferentes proyectos productivos de la granja (*Figura 8*) con resultados positivos.

El uso de un diluyente con base de lecitina de soya, no fue favorable para la crio preservación de semen cunícola ya que no mantuvo la motilidad individual, viabilidad espermática e integridad de la membrana plasmática; pero si la dilución y utilización del semen en fresco.

Capítulo 5. Conclusiones

Se concluye que el uso de lecitina de soya en nivel de 10% frente a solución final es efectiva para la preservación de semen cunícola a 5°C con relación a la motilidad individual, viabilidad espermática, e integridad de la membrana plasmática.

Ninguno de los tres niveles de inclusión fue viables para el proceso de crio preservación para la motilidad individual, viabilidad espermática e integridad de la membrana plasmática.

La curva de enfriamiento puede afectar el proceso de crio preservación cuando se utiliza lecitina de soya en conejos.

Capítulo 6. Recomendaciones

Se recomienda evaluar el tiempo de estabilización del semen diluido así como las curvas y tiempos al momento de congelación.

Para la preparación de los niveles de inclusión tener la mayor cadena de bioseguridad posible.

Referencias

- Álvarez de Toledo, B. (2014). Informe del sector cunícola Argentino. *Alimentos Argentinos*, (312), 24.
- Battaglini, M. (1982). *La « enciclopedia » de la cunicultura*. 67–72.
- Cajiao, H. A. (2013). Industria cunícola , un negocio por explotar. Obtenido: Periódico La República website: <https://bit.ly/35wnS4w>
- Calviño, D. L., Sánchez, D. M. E., & García, D. . (2017). Artículo de revisión. Aspectos farmacológicos de la lecitina de soya y sus posibles aplicaciones médicas Pharmacological aspects of soy phosphatidylcholine and its possible medical uses. *Medisan*, 21(1), 83. Obtenido: <https://bit.ly/2QOapRx>
- Enciso Lorences, M. (2009). *La fragmentación del adn en espermatozoides de mamíferos*. 410. Obtenido: <https://bit.ly/2RK63v2>
- Ferrian, S. (2007). *Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación*. Obtenido: <https://bit.ly/2t9I12u>
- García, M., Andrés, I., Caselles, P., & Lavara, R. (2004). Estudio de la edad de los machos de conejo en la inseminación artificial (Vol. 18). Obtenido: <https://bit.ly/35aXspi>
- Gonzáles, H., & Gonzáles, M. (2005). Biotecnología Reproductiva: Una Alternativa Para Mejorar La Producción Animal. *Biotempo*, 5(5–11), 5–11. Obtenido: <https://bit.ly/2LL6gKO>
- Google. (2018). Google Earth. *Journal of Snow Engineering of Japan*, Vol. 34, pp. 1–12. Obtenido: https://doi.org/10.32120/jsej.34.1_1
- ICA. (2001). *RESOLUCIÓN 02820*.
- Mellisho, E. (2010). Evaluacion De Calidad Seminal. *Manual De Laboratorio De Reproducción*

- Anima*, (pág. 6). Obtenido: <https://bit.ly/2RJfU4w>
- Minitube. (2018). *Diluyente sin yema de huevo para semen bovino*.
- Rodríguez De Lara R. y Fallas, L. M. (1993). *Sincronización de estros en conejas nulíparas mediante cambios de lugar y jaula y su efecto sobre el comportamiento reproductivo en inseminación artificial s Trabajo Original*.
- Rosato, Rebollar, Iaffaldano, . (2006). *semen during storage*. 9–13. Obtenido: <https://bit.ly/2Mab7Fv>
- Rosero Peñaherrera, M. A., Núñez-Torres, O. P., & Lozada-Salcedo, E. E. (2018). Evaluación de tres diluyentes naturales para semen fresco de conejo en la inseminación artificial. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 5(1), 23–32.
- Sánchez-Rodríguez, A., Lorenzo, P., & Rebollar, P. (2015). Producción y calidad espermática del eyaculado de conejo según el ritmo de recogida. *Boletín de Cunicultura N° 178*, 16–20.
- Silva, N. (2016). *Estudio de mercado para la carne de conejo de la asociación; agropeinte; S.A.S en el municipio Duitama*. Obtenido: <https://bit.ly/2OMQvn8>
- Trejo, C. A., Meza, V. V. M., Antonio, E. C., Cotera, R. J., & Antonio-Cisneros, C. M. (2013). Agua de coco (*Cocus nucifera*) como diluyente para semen fresco de conejo en la inseminación artificial. *Archivos de Zootecnia*, 62(238), 299–302.
- UFPSO. (2016). *UFPS Ocaña - UFPS Ocaña*.
- Vicente, J, Lavara, R, Viudes de Castro, M, M. F. (2019). Técnicas y manejo reproductivo del conejo. *INIA Serie Técnica*, 47–61. Obtenido:<https://doi.org/10.35676/inia/st.216>