



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN  
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto:

**Comparación de tres dilutores comerciales en la criopreservación de semen de bovinos Criollos durante dos épocas del año**

2. Área de Investigación:

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Producción Animal	Reproducción Animal	

3. Duración del proyecto (meses): 12

4. Tipo de proyecto: Individual

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	MVZ, MgSc, DrSc (c): <b>Faustino Quispe Condori</b>
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	966437745
Correo Electrónico	faustino2801@yahoo.es

## RESUMEN

Uno de los principales factores conocidos que influyen sobre la calidad y fertilidad del semen bovino criopreservado es el dilutor usado. La yema de huevo es usado como un crioprotector del semen en diferentes especies de mamíferos incluyendo los bovinos. En el Centro Experimental Chuquibambilla de la UNA Puno, con los objetivos de comparar el efecto de tres dilutores comerciales sobre la motilidad individual y estado de la membrana espermática en semen descongelado en dos épocas del año se utilizarán eyaculados de toros criollos, el semen se colectará por el método de vagina artificial y la criopreservación mediante la técnica de paso único. Los datos se analizarán mediante un arreglo factorial de 3x2 en un Diseño Completo al Azar y la diferencia se comparará a través de la prueba de Duncan a un nivel de significancia de 0.05. se espera lograr motilidad aceptable al descongelamiento.

Palabras claves (Keywords) Criopreservación, dilutores de semen, toros, raza, épocas.



## ABSTRACT

One of the main known factors influencing the quality and fertility of cryopreserved bovine semen is the dilutor used. Egg yolk is used as a semen cryoprotector in different species of mammals including bovines. In the Chuquibambilla Experimental Center of UNA Puno, in order to compare the effect of three commercial dilutors on individual motility and state of the sperm membrane in thawed semen at two times of the year, ejaculates from criollo bulls will be used, the semen will be collected by the artificial vagina method and cryopreservation by the single-pass technique. The data will be analyzed using a 3x2 factorial arrangement in a Complete Random Design and the difference will be compared through Duncan's test at a significance level of 0.05. acceptable motility is expected upon thawing.

Keywords (Keywords) Cryopreservation, semen diluents, bulls, breed, epochs.

## Justificación del proyecto

El bovino criollo es la raza más antigua de las que existen en América y en el mundo. El bovino criollo americano desciende directamente de los animales que llegaron en el segundo viaje de Colón en 1493; de esta manera, llegaron a todos los confines del continente adaptándose rápidamente a las diversas condiciones climáticas. Es relativamente poco lo que se sabe con certeza acerca de los ancestros de los bovinos criollos. Estos animales, así como posteriores envíos, llegaron a la isla denominada La Española, hoy asiento de la República Dominicana y Haití. Descendían directamente del *Bos primigenius*, domesticado probablemente en la zona pirenaica a partir del paleolítico. Sevilla era la ciudad que tenía la exclusividad para organizar los embarques oficiales a América (Primo, 1992).

En América Latina, la actividad ganadera representa el uso más significativo de la tierra, siendo la actividad que más favorece y aporta al producto interno agropecuario de los diferentes países. El manejo de la ganadería a través del tiempo ha desarrollado en los bovinos la combinación de varias razas entre ellas, gracias al enfoque de los cruzamientos entre *Bos taurus* (razas productoras de leche) y *Bos indicus* (cebú) como productoras de carne, en busca de un sistema de producción de doble propósito, de la rusticidad y adaptación al medio ambiente, llegando a perder la genética entre las líneas raciales y sus potenciales productivos en cuanto a carne, leche y crías al año, afectando al sector productor ganadero en niveles de calidad y cantidad, lo que influye directamente en la rentabilidad y pérdidas económicas para los ganaderos por costos de producción de



la crianza y mantenimiento de los animales en sus empresas ganaderas (Marizancén y Artunduaga., 2017).

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva, que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de transmisión de enfermedades sexualmente transmisibles. Cuando un toro muere en forma inesperada, su material genético se pierde. Una forma de preservar el germoplasma de estos animales es mediante la colección de semen y posterior criopreservación (Ribeiro-Peres y col., 2014).

### **I. Antecedentes del proyecto**

En la preparación del dilutor Tris fructosa ácido cítrico para semen bovino de raza Holstein, incorporando en el primer tratamiento 15% de yema de huevo y en el otro tratamiento 5% de la leche entera de soya; la motilidad de espermatozoides después de la descongelación fue de  $48.4 \pm 1.2$  y  $43.4 \pm 1.0\%$ , respectivamente (El-Keraby *et al.*, 2010).

En la comparación del dilutor estándar TFYG con los dilutores comerciales Bioxcell y Optixcell en semen de Búfalo, a la descongelación seminal se encontraron como porcentajes de motilidad progresiva de  $47.71 \pm 0.79$ ,  $44.38 \pm 0.85$ ,  $49.90 \pm 0.90$  y de  $45.02 \pm 0.84$ ,  $42.31 \pm 0.82$ ,  $47.81 \pm 0.90\%$  de rectividad HOST para los dilutores TFYG, Bioxcell y Optixcell, respectivamente (Chaudhari *et al.*, 2015).

Utilizando tres dilutores en la criopreservación de semen de toros de raza Nellore mediante una evaluación seminal por el método CASA se obtuvieron: motilidades progresivas de 40.48, 49.24 y 24.90% para los dilutores TRIS, Botu Bov y Botu Bov Lecitina-soya, respectivamente (Crespilho *et al.*, 2012).

Evaluando tres concentraciones de yema de huevo adicionando al dilutor comercial Triladyl para la criopreservación de semen de bovino se alcanzaron en lo que respecta a



motilidad progresiva pos-descongelación de  $40.09 \pm 21.0$ ,  $35.66 \pm 16.79$  y  $30.87 \pm 17.21\%$  en las concentraciones de 10, 20 y 30% de yema de huevo, respectivamente (Montoya-Páez y col., 2020).

En una investigación realizada en bovinos de la raza Gyr evaluando dilutores con yema de huevo y libres de yema se hallaron como motilidades progresivas de  $40.42 \pm 1.50$ ,  $42.08 \pm 1.62$  y de  $37.08 \pm 1.41\%$  con los dilutores Tris Fructosa Yema de huevo, Optixcell y Andromed, respectivamente (Chaudhary *et al.*, 2018).

Moreno-Avalos y col, (2021) en el semen criopreservado del macho cabrío obtuvieron como viabilidad  $51.0 \pm 13.0$ ,  $71.3 \pm 3.0$  y  $69.0 \pm 3.1\%$  para los dilutores andromed, citrato-yema y tris-yema de huevo, respectivamente.

#### PRINCIPIOS DE PRESERVACION DE SEMEN

Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la inseminación artificial. Sin embargo, la reducción de la temperatura por debajo de los  $37^{\circ}\text{C}$  y, principalmente de los  $20^{\circ}\text{C}$  induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide. El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los  $-15$  y  $-60^{\circ}\text{C}$  (en el cual se producen los mayores daños) que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los  $-130^{\circ}\text{C}$  no existe agua en el estado líquido (Viotti, 2011).

La congelación lenta permite una deshidratación celular progresiva que provoca un aumento de la concentración intracelular de solutos lo que impide la formación de cristales intracelulares. En la congelación rápida, no hay tiempo suficiente para que se produzca el paso del agua intracelular al medio extracelular y por tanto la deshidratación. Es, por tanto, importante que el logro de una longevidad celular máxima, requiera que el ritmo de descongelación esté en concordancia con el ritmo apropiado de congelación (Hafez y Hafez, 2000).



El proceso de criopreservación incluye 5 etapas: dilución, refrigeración, adición del crioprotector, congelación y descongelación. Mientras que algunas fases son relativamente inocuas, otras son muy estresantes, como es el caso de la refrigeración y la congelación. Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y con el metabolismo celular. Uno de los problemas más evidentes en los procesos de conservación del semen, es el conjunto de alteraciones en el espermatozoide, designadas colectivamente como “choque térmico” (Foote, 2002).

### FACTORES QUE AFECTAN LA CRIOPRESERVACION DE SEMEN

La congelación del semen bovino se ve afectada por varios factores (Peris-Frau., *et al* 2020), entre ellos, se encuentran:

- a).- La composición del diluyente
- b).- El tipo y concentración del crioprotector utilizado
- c).- El método de adición del crioprotector
- d).- El período de equilibrio de los espermatozoides
- e).- , empaque sistema de semen diluido,
- f).- La velocidad de congelación y régimen de descongelación.

### DILUYENTES DE SEMEN PARA CRIOPRESERVACION

Los diluyentes son compuestos químicos, o conjunto de sustancias que preservan la viabilidad y fertilidad del semen, a la vez que posibilitan el procesamiento de un número previamente establecido de espermatozoides, acondicionados en envases adecuados, de un tamaño conveniente para la inseminación (Raheja *et al.*, 2018).

Al mezclar espermatozoides con diluyentes (extensores), se agregan muchos ingredientes que los mantienen y protegen, preservando por lo tanto su fertilidad hasta el momento de la inseminación (Boeta y col., 2018). Las funciones de un diluyente son:

- 1) Proveer nutrientes a los espermatozoides, como fuente de energía.
- 2) Proteger los espermatozoides contra los efectos dañinos de un enfriado rápido.
- 3) Proveer un buffer para prevenir efectos nocivos de cambios de pH al formarse ácido láctico, resultante del metabolismo de la glucosa por los espermatozoides.



- 4) Mantener una presión osmótica y un balance electrolítico adecuado.
- 5) Inhibir el crecimiento bacteriano.
- 6) Aumentar el volumen de semen de modo que pueda ser utilizado para múltiples inseminaciones.
- 7) Proteger los espermatozoides del congelado.

La yema de huevo y/o la leche se han utilizado durante mucho tiempo como componentes fundamentales en casi todos los diluyentes de semen bovino utilizados. En los últimos años ha habido frecuentes argumentos en contra de la incorporación de sustancias de origen animal en la formulación de diluyentes de semen (Akhter et al., 2017). Estos autores mencionaron que la presencia de yema de huevo en el medio de congelación puede interferir con la integridad del proceso de congelación de los espermatozoides. Lo relacionaron con la amplia variabilidad de estas sustancias en su composición, fuente y grado de contaminación bacteriana o micoplasmática. Dicha contaminación podría ser una posible causa de indotoxinas capaces de afectar la capacidad fertilizante de los espermatozoides. También se ha presumido que la adición de yema de huevo a los dilutores de semen puede afectar adversamente la integridad acrosómica de los espermatozoides.

## EVALUACION DE SEMEN BOVINO DESCONGELADO

En la evaluación de semen descongelado se deben tener en cuenta al menos 3 parámetros básicos (Catena y Cabodevila, 1999), ellos son:

- ✓ Viabilidad post-descongelación.
- ✓ Morfología.
- ✓ Número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis inseminante.

### **Viabilidad post-descongelación**

La viabilidad post-descongelación se determina mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el vigor espermático. El daño a la membrana puede no ser completamente expresado inmediatamente después de la descongelación. Por ello, el semen debe ser incubado a 37°C durante 2 horas, esta evaluación es conocida como prueba de termoresistencia o de incubación.



**Examen de motilidad:** el porcentaje de motilidad progresiva y el vigor son determinados inmediatamente después de descongelado y luego de 2 horas de incubación. Diversos métodos pueden ser utilizados para determinar motilidad. Cuando se cuenta con experiencia, generalmente se realizan estimaciones visuales rápidas, sin efectivamente contar células.

**Técnica:** una gota de semen se coloca entre porta y cubreobjetos a 37°C, procediendo a evaluar a 100 aumentos el porcentaje de motilidad progresiva y luego la tasa de progresión (Vigor). Esta puede ser cuantificado utilizando la siguiente escala:

0= sin movimiento.

1= ligera vibración de cola, sin progresión.

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

3= movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.

4= movimiento progresivo, rápido.

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

El semen de buena calidad, que ha sido recientemente descongelado, normalmente tiene 40 a 50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3 a 4. Después de 2 horas de incubación, estos valores generalmente disminuyen un 10 – 15% y 1 punto, respectivamente.

### **La morfología espermática**

Se determina mediante la coloración de eosina-nigrosina por carecer del paso de lavado, por tanto, las características de morfología se descubren en el frotis. El concepto de defectos primarios y secundarios sirve bien para evaluar la aptitud reproductiva de un toro pero no para predecir la fertilidad de semen congelado; por definición un defecto primario es aquél que se origina durante la espermatogénesis dentro de los testículos y un defecto secundario, el que se origina dentro del epidídimo o en el laboratorio. Se exige un 70% de espermatozoides normales.

### **Número de espermatozoides con motilidad progresiva por dosis**

Surge de multiplicar el número de espermatozoides totales por el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva a la hora 0 pos descongelación.

Las normas ISO 9002 establecen que la dosis inseminante debe tener un mínimo de 8



millones de espermatozoides con motilidad progresiva. Este número puede reducirse a 6 millones si el semen posee más de 30% de espermatozoides con motilidad progresiva y si la tasa de anormalidades es inferior al 25%.

### Hipótesis del trabajo

H0: La motilidad progresiva y la integridad de la membrana espermática post-descongelación serán similares para los tres dilutores comerciales y durante las dos épocas.

H1: La motilidad progresiva y la integridad de la membrana espermática post-descongelación serán diferentes para los tres dilutores comerciales y durante las dos épocas.

### Objetivo general

Evaluar las características seminales en toros criollos empleando dilutores comerciales durante dos épocas del año 2021.

### Objetivos específicos

7.1. Comparar la motilidad progresiva de los espermatozoides descongelados y procesados usando dilutores comerciales durante dos épocas del año.

7.2. Comparar el estado de la integridad de la membrana espermática de los espermatozoides descongelados y procesados mediante el test HOST durante dos épocas del año.

### Metodología de investigación

#### Material experimental:

El estudio se realizará con toros criollos con una edad de 3 a 4 años, distribuidos de la siguiente forma:

Epocas	Dilutores		
	Triladyl	Optixcell	Andromed
Lluvias ( n )	20	20	20
Secas ( n )	20	20	20
total	40	40	40





## FRECUENCIA DE COLECCION DE SEMEN Y PROCESAMIENTO:

Época de lluvias se realizará 02 veces, uno de prueba y otro en forma definitiva, Igualmente para la época de secas.

El semen se coleccionará mediante el método de vagina artificial con toda la técnica para toros. La técnica de congelamiento se realizará por el de paso único para los tres dilutores porque la composición ya viene con el crioprotector.

## MANEJO ALIMENTARIO

Los animales serán alimentados sobre pastos naturales y cultivados (asociación de alfalfa + dactylis glomerata) las que se encuentran en las inmediaciones del establo y el laboratorio de Biotecnología del Centro Experimental Chuquibambilla, asimismo recibirán ensilado de avena en cantidad suficiente durante la época seco (Julio- Octubre) por cuanto estos animales se encuentran sujetos con soga en estas.

## ANALISIS ESTADISTICO

Como los datos se expresarán en porcentajes, entonces antes de someter al análisis se les realizará la prueba de normalidad con la Prueba Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas. Asimismo, previo a un análisis de varianzas, las variables en porcentajes serán transformados al arcoseno (Steel/Torrie., 1995) según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ transformado} = 2 \operatorname{Ar} \cos e n \sqrt{Y_{ijk}/100}$$

Los datos se procesarán mediante un arreglo factorial de 3x2 bajo un diseño completo al azar, cuto modelo aditivo lineal es la siguiente (Steel/Torrie., 1995):

$$Y_{ijk} = \mu + Ai + Bj + (AB)ij + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta (motilidad individual total y % de membranas intactas).

$\mu$  = Media general.

$Ai$  = Efecto del factor A (dilutores) (i= 1.....3).

$Bi$  = Efecto del factor B (épocas) (2).

$AB_{ij}$  = efecto de la interacción.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental.

Los promedios se compararán mediante la prueba de Duncan a un nivel de significación =0.05.



## Referencias Bibliográficas

Akhter, S., Rakha, B.A, Ansari, M.S, Husna, A.S, Iqbal, S., Khalid, M. (2017). Evaluation of quail and turkey egg yolk for cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Theriogenology*, 87, 259-265.

Boeta, M., Balcazar, A., Cerbón, J.L., Hernandez, J., Valencia, J y Zarco, L. (2018) *Fisiología Reproductiva de los animales domésticos*, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México, 542 p.

Catena, M., Cabodevila, J. (1999). Evaluación de semen bovino congelado. *Revista Taurus*, 1(3):18-31.

Crespihlo, A.M., Sá Filho, M.F., Nichi, M., Monteiro, G.A., Avanzi, B.R. (2012) Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science* 149: 1-6.

Chaudhari, D.V., Dhani, A.J., Hadiya, K.K and Patel, J.A. (2015) Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen. Disponible en [www.veterinaryworld.org/vol.8](http://www.veterinaryworld.org/vol.8).

Chaudhary, P.J., Dhani, A.J., Chaudhari, D.V., Hadiya, K.K and Patel, J.A. (2018) Efficacy of egg yolk based and egg yolk free soya vean milk based extenders for cryopreservation of Zebu cattle and buffalo semen. *Indian J. Anim. Res.* 52 (8): 1134-1140.

El-Keraby, F.E., Osman, K.T., Ganah, H.B and El-Siefy, E.M. (2010) Soymilk-based entender for cryopresertation of bovine semen. *J. of Animal and Poultry Production*, vol. 1 (2): 61-69.

Foote, R.H. (2002) *The history of Artificial Insemination: selected notes and notables*. American Society of animal Science, 1 - 10.



Hafez, E.S.E y Hafez, B. (2000) Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 7ma. Ed. 519 p.

Marizancén, M.A., Artunduaga, L. (2017). Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. Revista de investigación agraria y ambiental 8 (2): 247-259.

Montoya-Páez, J.D; Giraldo-León, M; Duque-Cortes, J.E. (2020) Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo centrifugada en la criopreservación de semen bovino. Rev Inv Vet Perú, 31 vol N° 2.

Moreno-Avalos, S., Veliz-Deras, F., Calderón-Leyva, G., Contreras-Villareal, V., Guillén-Muñoz, J., Angel-García, O. (2021). Determinación de la calidad de semen criopreservado con lecitina de soya o yema de huevo en machos cabríos. Abanico Veterinario, 11, 1-12.

Peris-Frau, P; Soler, A.J; Martín-Maestro, A; Sánchez-Ajofrín, I; Medina-Chávez, D.A; Fernández-Santos, M.R; García-Álvarez, O; Maroto-Morales, A; Montoro, V and Garde, J. (2020) Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality. International Journal of Molecular Sciences, a review; 22 p.

Primo, A.T. (1992). El ganado bovino Ibérico en la Américas: 500 años después. *Arch.Zootec* 41 (154): 421-432.

Raheja, N; Choudhary, S; Grewal, S; Sharma, N and Kumar, N. (2018) A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6 (3): 239-245.

Ribeiro-Peres, A; Munita-Barbosa, L; Yumi-Kanazawa, M. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch Med Vet* 46: 31-38

Viotti, G. (2011). Procesamiento de semen bovino para la inseminación artificial. Tesis



de grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República Montevideo Uruguay. —

**Uso de los resultados y contribuciones del proyecto** (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)

Los resultados obtenidos servirán para el conocimiento de los estudiantes de producción de vacunos y a los del curso de biotecnología reproductiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Asimismo, se aplicarán para el procesamiento de semen de toros Brown Swiss de los productores de la zona norte de la región de Puno y por ende a nivel nacional si así lo consideran los interesados.

### **Impactos esperados**

#### **i. Impactos en Ciencia y Tecnología**

El impacto en este rubro es la investigación aplicada en producción animal.

#### **ii. Impactos económicos**

Como impacto económico es de que el procesamiento del semen genera utilidades muy apreciables, puesto que, de una colección que por ejemplo sea 8 ml se pueden lograr más de 200 dosis de semen congelado y si cada uno se vende a 10 soles entonces tienen buen impacto económico.

#### **iii. Impactos sociales**

Hacia la sociedad es la transferencia tecnológica.

#### **iv. Impactos ambientales**

No existe impacto por cuanto esta metodología no contamina el ambiente ya que se trata de reproductores en menor número, esto a causa de que el vacuno está considerado como contaminador ambiental por emitir el gas metano a través del eructo.

### **Recursos necesarios**

Humanos:

Persona responsable del manejo de los toros.



**Materiales (equipos):**

Material de vidrio como: tubos de colección graduados, láminas porta y cubreobjetos, frascos Erlenmeyer de capacidades diferentes.

Adquisición de refrigeradora pequeño tamaño.

Adquisición de vagina artificial, fundas.

Adquisición de dilutores comerciales, agua desionizada y tridestilada.

Pajillas de 0.5 ml.

Alcohol polivinílico o sellador de pajillas.

Nitrógeno líquido.

Papeles de aluminio y de toalla.

Material de escritorio (papeles, cuaderno de campo, lapiceros, etc).

Ropa de trabajo (mamelucos, botas de jebe, etc).

Viáticos para llegar al lugar.

**Localización del proyecto** (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

La investigación se llevará a cabo en el Centro Experimental Chuquibambilla, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA Puno, ubicado en el Distrito de Umachiri, Provincia de Melgar a 175 km de la capital de la región Puno.

**Cronograma de actividades**

Actividad	Trimestres												
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Elaboración de proyecto	X	X											
Adquisición de materiales y equipos			X										
Adiestramiento de toros y pruebas en blanco		X	X										
Colección, procesamiento de semen		X	X	X									
Evaluación de semen descongelado					X								
Presentación de avance de la investigación						X			X				
Revisión bibliográfica.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Colección, procesamiento de semen									X	X	X		
Evaluación de semen descongelado de la época seca.													X
Presentación informe final													X



## Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Equipo de colección	pieza	1200.00	01	1200.00
Dilutores comerciales	Frascos	Varía según dilutor	03	950.00
Material de vidrio	ml	Depende de capacidad	varios	450.00
Refrigeradora	unidad	890.00	01	890.00
Pajillas de 0.5 ml	Bolsa x 1000	870.00	01	870.00
Papel aluminio	unidad	25.00	02	50.00
Papel toalla	Bolsa x 3	20.00	03	60.00
Nitrógeno líquido	Kg	25.00	35	875.00
IMPREVISTOS				800.00
<b>TOTAL:</b>				<b>6,145.00</b>

NOTA: la asignación de 264.00 soles al mes no alcanza ni para pasajes.