

# UCUENCA

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**“Efecto de la jalea real suplementada a diluyentes de base sintética y no sintética sobre criosupervivencia de esperma bovino”**

Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Médico  
Veterinario Zootecnista

Autores:

Jacqueline Estefanía Guanga Tenempaguay

CI: 0105426811

Correo electrónico: [jacquelineguanga94@gmail.com](mailto:jacquelineguanga94@gmail.com)

Juan Ismael Lucero Zhumi

CI: 0106012909

Correo electrónico: [juan.luceroucuenca@gmail.com](mailto:juan.luceroucuenca@gmail.com)

Director:

Luis Rodrigo Galarza Álvarez., Mgs., MVZ

CI: 0103305405

**Cuenca, Ecuador**

22-noviembre-2022

## Resumen

La jalea real (JR) es un producto segregado por las abejas nodrizas (4 y 11 días de edad) y contiene vitaminas, proteínas, enzimas, aminoácidos y minerales. Existe información limitada sobre el efecto positivo de la jalea real en la criopreservación de espermatozoides de rumiantes, sus componentes beneficiosos pueden potenciarse en diferentes diluyentes. Esta investigación evaluó el efecto de la suplementación de JR en diluyentes sintéticos (TCG = tris, ácido, cítrico, glucosa + 6 % de yema de huevo) y no sintéticos (UHT = leche descremada + 6 % de yema de huevo) sobre la criosupervivencia de espermatozoides de toro después de los procesos de refrigeración, congelación y vitrificación. En un primer experimento, se utilizaron 9 eyaculados de 3 toros sanos (3 eyaculados/semana) para determinar la concentración más adecuada de JR (p/v) a 0 (T0, control); 0,25 (T1); 0,45 (T2); 0,6% (T3); 0,8% (T4) y 1 % (T5) suplementados a los diluyentes TCG y UHT sobre la cinemática de espermatozoides refrigerado durante 96 horas. Los resultados demostraron que una dosis baja de 0,2 % de JR (T1) suplementada a ambos diluyentes tiene un efecto positivo sobre la motilidad progresiva y las velocidades (curvilínea [VCL] y rectilínea [VSL]) del espermatozoides refrigerado a largo plazo. En un segundo experimento, se utilizaron 15 eyaculados de 3 toros (3 eyaculados/semana) para evaluar el efecto de la suplementación de 0,2 % de JR a diluyentes de congelación (TCG+5 % de glicerol) y vitrificación (TCG+100 de sacarosa). Se formaron cuatro grupos según el método de criopreservación (congelación [CONG] y vitrificación [VIT]) y la adición o no (control) de JR: (1) CONG-Co, (2) CONG-JR, (3) VIT-Co, (4) VIT-JR. Los resultados mostraron que durante la congelación (CONG-JR vs. CONG-Co,  $P < 0,05$ ), la JR aumentó VCL, VSL y frecuencia de latido (BCF); mientras que durante la vitrificación (VIT-JR vs. VIT-Co,  $P < 0,05$ ), la JR mejoró el BCF y la integridad de las membranas plasmáticas y acrosómicas. Se concluye que la adición de 0,2% de JR a los diluyentes TCG y UHT mejora la cinemática del espermatozoides bovino refrigerado, además, la JR protege mejor las membranas espermáticas durante la vitrificación que el proceso de congelación.

# UCUENCA

**Palabras clave:** Jalea real. Vitrificación. Membranas. Semen. Criopreservación. Abeja. Diluyentes. Velocidades. CASA.

## Abstract

Royal jelly (RJ) is a nutrient produced by nurse bees (4 and 11 days old) and contains vitamins, proteins, enzymes, amino acids, and other minerals. There is limited information on the positive effect of royal jelly in ruminant sperm cryopreservation; its beneficial components may be enhanced in different diluents. This investigation evaluated the effect of RJ supplementation in synthetic (TCG= tris, acid, citric, glucose + 6% egg yolk) and non-synthetic (UHT= skim milk + 6% egg yolk) diluents on cryosurvival of bull spermatozoa after refrigeration, freezing and vitrification processes. In a first experiment, 9 ejaculates from 3 healthy bulls (3 ejaculates/week) were used to determine the most suitable concentration of RJ (w/v) at 0% (T0, control); 0,2% (T1); 0,4% (T2); 0,6% (T3); 0,8% (T4) and 1% (T5) supplemented with TCG and UHT extenders on the kinematics of refrigerated sperm for 96 hours. The results demonstrated that a low dose of 0,2% RJ (T1) supplemented to both extenders has a positive effect on progressive motility and velocities (curvilinear [VCL] and rectilinear [VSL]) of chilled bull sperm in the long-term. In a second experiment, 15 ejaculates from 3 bulls (3 ejaculates/week) were used to evaluate the effect of supplementation of 0,2% RJ (w/v) to freezing extenders (TCG+5% glycerol) and vitrification (TCG+100 sucrose). Four groups were formed according to the cryopreservation method (freezing [CONG] and vitrification [VIT]) and the addition or not (control) of RJ: (1) CONG-Co, (2) CONG-RJ, (3) VIT-Co, (4) VIT-RJ. The results showed that during freezing (CONG-RJ vs. CONG-Co,  $P < 0.05$ ), RJ increased VCL, VSL, and beat frequency (BCF), while during vitrification (VIT-RJ vs. VIT-Co,  $P < 0,05$ ), the RJ improved the BCF and integrity of plasma and acrosome membranes. It is concluded that the addition of 0,2% RJ to TCG and UHT extenders improved chilled bovine sperm kinematics. In addition, The RJ better protects sperm membranes during vitrification than the freezing process.

Keywords: Royal jelly. Vitrification. Membranes. Semen. Cryopreservation. Bee. Extender. Speeds. CASA.

## Índice de contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	4
Índice de figuras.....	11
Índice de tablas.....	14
Índice de anexos.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
<b>2.1. Objetivo general.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3. Hipótesis.....</b>	<b>24</b>
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	25
<b>3.1. Criopreservación de espermatozoides bovinos.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.1. Estrés oxidativo.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2. Apoptosis de espermatozoides.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. Diluyentes.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.1. Diluyentes en base a Leche.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2. Diluyente a base de yema de huevo.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.3. Diluyentes TRIS (hydroxymetil amino metano).....</b>	<b>28</b>
<b>3.3. Agentes crioprotectores.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4. Aditivos: Jalea real (JR).....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.1. Composición química.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.2. Propiedades y usos.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.3. Producción de jalea real.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.4. Factores que inciden en la producción.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5. Almacenamiento de esperma bovino líquido (refrigeración).....</b>	<b>35</b>
<b>3.6. Métodos de congelación.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6.1. La congelación lenta:.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6.2. La congelación rápida.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7. Congelación convencional (lenta) con vapores de nitrógeno líquido.....</b>	<b>37</b>

# UCUENCA

3.8. Vitriificación cinética .....	37
3.9. Análisis de calidad espermática (CASA y Fluorescencia) .....	38
3.9.1. Sistema computarizado de Análisis Seminal (CASA) .....	38
3.9.2. Evaluación seminal mediante técnicas fluorescentes .....	39
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
4.1. Materiales .....	41
4.1.3. Materiales biológicos .....	42
4.1.4. Reactivos .....	42
4.2. Área de estudio .....	43
4.3. Elaboración de diluyentes y medios. ....	43
4.4. Diseño experimental .....	45
4.5. Metodología .....	48
4.5.2. Reproductores y recolección de semen .....	49
4.5.3. Experimento 1. Determinación de la concentración óptima de JR 50	
4.5.4. Experimento 2. Efecto de la jalea real en semen bovino congelado y vitriificado .....	50
4.5.5. Congelación .....	51
4.5.6. Vitriificación .....	51
4.5.7. Análisis de calidad espermática.....	52
4.6. Análisis estadístico.....	53
5.1. Experimento 1. Determinación de la concentración óptima de JR .....	55
5.2. Experimento 2. Efecto de la JR en semen bovino congelado y vitriificado.....	62
5.2.1. Cinemática espermática.....	62
5.2.2. Integridad de membranas .....	65
6. DISCUSIÓN .....	68
CONCLUSIONES.....	71
8. BIBLIOGRAFIA .....	72
7. ANEXOS .....	80

## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Jacqueline Estefanía Guanga Tenempaguay en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la jalea real suplementada a diluyentes de base sintética y no sintética sobre criosupervivencia de esperma bovino", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de noviembre de 2022



---

Jacqueline Estefanía Guanga Tenempaguay

C.I: 0105426811

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Jacqueline Estefanía Guanga Tenempaguay, autora del trabajo de titulación "Efecto de la jalea real suplementada a diluyentes de base sintética y no sintética sobre criosupervivencia de esperma bovino", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 22 de noviembre del 2022



---

Jacqueline Estefanía Guanga Tenempaguay

C.I: 0105426811



## Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Juan Ismael Lucero Zhumi en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la jalea real suplementada a diluyentes de base sintética y no sintética sobre criosupervivencia de esperma bovino", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 22 de noviembre 2022



Juan Ismael Lucero Zhumi


0106012909

## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Juan Ismael Lucero Zhumi, autor del trabajo de titulación "Efecto de la jalea real suplementada a diluyentes de base sintética y no sintética sobre criosupervivencia de espermatozoides bovinos", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca 22 de noviembre 2022



---

Juan Ismael Lucero Zhumi  
01060129099

## Índice de figuras

**Figura 1:** Experimento 1. Ubicación del área de estudio (Azuay –Baños y Victoria de Portete). Fuente: Directorio cartográfico de Google Maps, 2020.

**Figura 2.** Concentración idónea de JR suplementado a dos diluyentes, uno de base sintética TCG (tris, ácido cítrico, glucosa, 6% yema de huevo), y otro de base no sintética UHT (leche descremada tratada con ultra calor más 6% de yema de huevo).

**Figura 3.** Experimento 2. Efecto de la jalea real en semen bovino congelado y vitrificado

**Figura 4.** Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de esperma bovino diluido con TCG y UHT, suplementados con 0 (control, T0); 0,2 (T1); 0,4 (T2); 0,6 (T3); 0,8 (T4); y 1% (T5) de Jalea Real, y refrigeradas durante 48 y 96 h. Presencia diferentes símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (\* -  $\alpha$  -  $\beta$   $P < 0,01$ ; \* -  $\beta$   $P < 0,001$ ). Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras almacenadas durante 48 h ( $A-B-C$   $P < 0,05$  para muestras frescas;  $a-b-c$   $P < 0,05$  para muestras refrigeradas durante 48 h; y  $x-y-z$   $P < 0,01$  para muestras refrigeradas durante 96 h).

**Figura 5.** Velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL) de esperma bovino diluido con TCG y UHT, suplementados con 0 (control, T0); 0,2 (T1); 0,4 (T2); 0,6 (T3); 0,8 (T4); y 1% (T5) de Jalea Real, y refrigeradas durante 48 y 96 h. Presencia diferentes símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (\* -  $\alpha$  -  $\beta$   $P < 0,01$ ; \* -  $\beta$   $P < 0,001$ ).

# UCUENCA

**Figura 6.** Índice de rectitud (STR) y linealidad (LIN) de esperma bovino diluido con TCG y UHT, suplementados con 0 (control, T0); 0,2 (T1); 0,4 (T2); 0,6 (T3); 0,8 (T4); y 1% (T5) de Jalea Real, y refrigeradas durante 48 y 96 h. Presencia diferentes símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (\* -  $\alpha$  -  $\beta$   $P < 0,01$ ; \* -  $\beta$   $P < 0,001$ ).

**Figura 7.** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de esperma bovino diluido con TCG y UHT, suplementados con 0 (control, T0); 0,2 (T1); 0,4 (T2); 0,6 (T3); 0,8 (T4); y 1% (T5) de Jalea Real, y refrigeradas durante 48 y 96 h. Presencia diferentes símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (\* -  $\alpha$  -  $\beta$   $P < 0,01$ ; \* -  $\beta$   $P < 0,001$ ).

**Figura 8.** Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de esperma bovino congelado – descongelado y vitrificado – calentado y suplementado con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a - b  $P < 0,001$ ).

**Figura 9.** Velocidad curvilínea (VCL), promedio (VAP), rectilínea (VSL) y parámetros de relación de progresión: rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB), de esperma bovino congelado – descongelado y vitrificado – calentado y suplementado con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a - b  $P < 0,01$ ).

**Figura 10.** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida del flagelo (BCF) de esperma bovino congelado – descongelado y vitrificado – calentado y suplementado con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a - b - c  $P < 0,05$ ; a - c,  $P < 0,001$ ).

# UCUENCA

**Figura 11.** Categorías de fluorescencia sobre el estado de las membranas plasmática y acrosómica de espermatozoides bovinos congelados – descongelados y vitrificados – calentados y suplementados con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a - b - c  $P < 0,05$ ; a - c,  $P < 0,01$ ).

**Figura 12.** Integridad de la membrana plasmática – viabilidad (IMA) y de la membrana acrosómica (IMA) de espermatozoides bovinos congelados – descongelados y vitrificados – calentados y suplementados con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a - b - c  $P < 0,05$ ; a - c,  $P < 0,01$ ).

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Composición química de la Jalea Real.

**Tabla 2.** Diluyente UHT (para refrigeración)

**Tabla 3.** Diluyente TCG (para congelación y vitrificación)

**Tabla 4.** Medio HEPES para fluorescencia

**Tabla 5.** Yoduro de propidio

**Tabla 6.** Aglutinina

**Tabla 7.** Tratamientos del Experimento 1

## Índice de anexos

Anexo 1. Equipo de trabajo (Juan, Dr. Luis G., Jacqueline)

Anexo 2. Colmenas para producir jalea real (RJ)

Anexo 3-4. Alimentación de abejas

Anexo 5. Suplemento alimenticio para abejas

Anexo 6. Traslarse

Anexo 7-8. Copaceldas para producir RJ y Colecta de RJ

Anexo 9-10-11. Traslado y extracción de RJ para su almacenamiento

Anexo 12-13. Ingredientes para elaboración de diluyentes

Anexo 14-15. Diluyentes preparados y centrifugación de diluyentes

Anexo 16-17. Dosificación de diluyentes con RJ y sin RJ, Congelamiento de diluyentes

Anexo 18. Extracción de semen toro Miguel (Nero)

Anexo 19. Extracción de semen toro Valentin (Irquis)

Anexo 20. Toro Coronel para extracción de semen (Irquis)

Anexo 21. Pajuelas con semen para congelación

Anexo 22-23. Vitrificación de semen y almacenamiento de pellets

Anexo 24. Evaluación de integridad de membranas (DPIA)

Anexo 25. Evaluación de integridad de membranas (IPDA)

## ACRONIMOS

JR: jalea real

ROS: Especies reactivas al oxígeno

LPO: Peroxidación lipídica

PUFA: Ácidos grasos polinsaturados

IA: Inseminación Artificial

IATF: Inseminación artificial a tiempo fijo

BHT: Butil hidroxitolueno

UHT: diluyente a base de leche descremada ultrapasteurizada

TCG: diluyente tris-ácido cítrico-glucosa

LDF: Fosfolípidos de baja densidad

TRIS: Diluyente para congelación

DMSO: Dimetil Sulfoxido

CASA: Analizador de espermatozoides asistido por computadora

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad rectilínea

MT: Motilidad Total

MP: Motilidad Progresiva

VAP: Velocidad promedio de desplazamiento

LIN: Porcentaje de linealidad

STR: Índice de rectitud

WOB: Índice de oscilación



# UCUENCA

ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza

BCL: Frecuencia de batido

DNA: Acido desoxirribonucleico

PI: ioduro de propidio

PNA: peanut agglutinin

PSA: pisum sativum agglutinin

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

YH: yema de huevo

CONG-Co: Congelación control

CONG-JR: Congelación con 0,2% jalera real

VIT-Co: Vitrificación control

VIT-JR: Vitrificación con 0,2% jalea real:

IPIA: membrana plasmática intacta y acrosoma intacto

IPDA: membrana plasmática intacta y acrosoma dañado

DPIA: membrana plasmática dañada y acrosoma intacto

DPDA: membrana plasmática y acrosoma dañados

GLM: modelo lineal general

# UCUENCA

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme la vida y con ello poder cumplir mis sueños y mis metas que me tracé siendo apenas una niña.

A mis abuelos María y Leoncio (+) a los que considero mis padres, por ser el pilar fundamental en mi vida, por todos sus consejos y sus sacrificios para sacarme adelante, siempre los llevaré en mi corazón.

A mis tíos Ana y Rafael que son mis segundos padres, por aceptarme y hacerme parte de su vida, y a pesar de que llegue a sus vidas cuando aún eran muy jóvenes supieron guiarme e inculcarme valores que siempre los tengo presentes. También a mis tíos Daniel, Mayra, Carmen y Enrique quienes me enseñaron que siempre puedo contar con ellos en las buenas y las malas y a pesar de todo lo malo que podía pasar siempre me apoyaron, con sus experiencias de vida me han enseñado que siempre debemos salir adelante con mucho esfuerzo y dedicación.

A mi esposo Alex, que llegó a mi vida para complementarla y por todo el amor y el apoyo incondicional, quien también me ha enseñado que todas nuestras metas se pueden cumplir solo es cuestión de imaginárnosla, trabajar en ellas y se harán realidad.

Sin olvidar a todos los involucrados en el desarrollo del presente trabajo. Al Dr. Luis Galarza por todo su tiempo que ha dedicado a esta investigación, al Dr. Andrés Galarza por su paciencia y tiempo en el que nos ha apoyado incondicionalmente ya que sin él no habríamos podido llevar a cabo nuestro trabajo, a los técnicos de laboratorio, así como a los directores de las Granjas les extiendo mis más sinceros agradecimientos.

*Jacqueline Guanga T.*

Al Dr. Andrés Galarza por toda su ayuda en el desarrollo de esta investigación y también por la paciencia que nos ha tenido por los inconvenientes que se presentaron.

A mi compañera de tesis Jacqueline por toda su dedicación y trabajo que le a puesto para poder terminar nuestra investigación.

**Juan Lucero**

# UCUENCA

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi familia, quienes me han apoyado a lo largo de mi vida siendo los padres que nunca tuve y demostrándome que la vida puede ser dura, pero uno siempre podrá cumplir sus sueños siendo constantes y trabajando por lo que se quiere. Ellos a pesar de las limitaciones que tienen siempre han hecho un espacio para mí en sus hogares en donde me han hecho sentir segura. A mi esposo por desvelarse junto a mí cuando realizaba esta investigación y por todo el apoyo que me dio cuando desfallecer. Es por ello que les dedico este trabajo y quiero que sepan que siempre serán un ejemplo de superación.

*Jacqueline Guanga T.*

## 1. INTRODUCCIÓN

El proceso de criopreservación de espermatozoides es una biotecnología reproductiva que permite la conservación de las células durante un tiempo indefinido (Castelo, 2008). La inseminación artificial (IA) y el uso de semen bovino criopreservado proveniente de reproductores de alto valor genético ha permitido, entre otras cosas, desarrollar programas de cruzamiento y mejora genética en el ganado bovino (de leche y carne) (Huanca, 2001). La IA bovina es usada como técnica básica que se usa en programas de sincronización del estro a tiempo programado, y transferencia de embriones a tiempo fijo (TATF) (Cal, 1991). La fertilidad en la vaca es multifactorial con énfasis prioritario en la respuesta ovulatoria de la vaca, sin embargo, un factor de especial interés en la actualidad es la respuesta del semen a la criopreservación (Whatson, 1995). La baja criosupervivencia espermática puede ocasionar fallas en la fertilidad y la repetición de celo en las vacas (Watson , 2000). Por esta razón, es importante promover procedimientos de criopreservación que mejoren la respuesta basados en una mejor locomoción, integridad y función celular.

Los espermatozoides bovinos son susceptibles a diversos mecanismos que causan estrés durante la criopreservación (Lozano , 2009). Durante el proceso de congelación y descongelación se producen daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales en muchos espermatozoides reduciendo la criosupervivencia y bajas tasas de fertilidad (Holt & Penfold, 2014). Los daños más graves que los espermatozoides sufren son causados por el choque de frío y el estrés osmótico (Grötter et al., 2019). Durante el descenso de temperatura, los espermatozoides son susceptibles a la producción excesiva de especies reactivas al oxígeno (ROS) debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en su membrana plasmática, provocando una mayor susceptibilidad a la peroxidación lipídica (LPO) (Membrillo et al., 2003). Además, los espermatozoides de toro también son vulnerables al ataque de los radicales libres (ej.  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y  $OH^-$ ) debido a que la membrana plasmática también es rica en PUFA (Viñan , 2017). Las ROS se combinan fácilmente con PUFA, lo que conduce a la producción

# UCUENCA

excesiva de peroxidación lipídica (LPO) (Álvarez et al., 1987). Como consecuencia de la LPO durante la criopreservación los espermatozoides disminuyen de la motilidad, la integridad de la membrana plasmática y acrosómica, en efecto, la fertilidad (Maxwell & Watson , 1996).

Para reducir los efectos perjudiciales de las ROS se usa compuestos antioxidantes suplementados al medio de congelación para bloquear o prevenir el estrés oxidativo. Entre los componentes antioxidantes tenemos el butil hidroxitolueno (BHT) que han sido probados en espermatozoides de toro (Cordova, 2010), así como también componentes tiolicos no proteicos como el Glutación (GSH) (Hernández, 2015), la cisteamina, trehalosa (Gutiérrez et al., 2009) y la sacarosa (Garcia, 2014).

Los antioxidantes pueden disminuir el efecto perjudicial de ROS y mejorar la calidad del espermatozoides congelado-descongelado (Murtary, 2021) Los antioxidantes protegen contra la formación de LPO en espermatozoides de toro congelado y descongelado, lo que permite valores aceptables de motilidad y porcentajes de células que muestran integridad de la membrana plasmática (Amidi et al., 2016).

La jalea real (JR) es un producto segregado por las glándulas hipofaríngeas y las glándulas mandibulares de las abejas nodrizas (5-14 días) (Zúñiga , 2019) . La JR es el alimento de las abejas obreras y zánganos hasta el tercer día, de larvas reinas hasta el quinto día y de la reina adulta durante toda su vida (Broto, 1989). La JR contiene cantidades considerables de proteínas (18%), lípidos (5,5%), azúcares (10-17%) y minerales (1%). Otros componentes de la JR son la vitamina A, B (*ácido pantoténico*, tiene efecto antioxidante), C, D y E; las sales minerales K, Ca, Na, Zn, Fe, Cu y Mn; y enzimas antibióticas (Sanchez, 2003). Se han reportado algunos resultados en especies como búfalos que al suplementar con JR y heparina al medio de capacitación mejoró la motilidad, integridad acrosomal y capacidad fertilizante de los espermatozoides criopreservados ( Abd-Allah, 2012). En otro estudio se obtuvo resultados positivos al adicionar JR al 0,5% y 0,75%, logrando extender la supervivencia y la longevidad de los espermatozoides de carnero, y en consecuencia, incrementó la fertilidad ( Alcay et al., 2016). (Allah, 2010) demostró

# UCUENCA

que la adición de 0,4% de JR al diluyente Tris mejoró y mantuvo los parámetros de función espermática de bovinos. Para nuestro mejor conocimiento, no se han reportado trabajos sobre el efecto de la JR en la vitrificación de espermatozoides bovinos.

La presente investigación intentó demostrar el efecto benéfico de la JR suplementada a diluyentes de base sintética y no sintética y evaluar la respuesta cinemática e integridad de membranas espermática durante los procesos de refrigeración a largo plazo (96 horas), congelación y vitrificación.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la Jalea Real suplementada a diluyentes de base sintética y no sintética sobre la criosupervivencia de espermatozoides de toro bajo condiciones de refrigeración, congelación y vitrificación.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración idónea de Jalea Real suplementada al diluyente de base sintética y no sintética, que proporcione mejor repuesta de cinética espermática bajo condiciones de refrigeración a mediano y largo plazo.
- Determinar el efecto de la Jalea Real suplementado a diluyentes de base no sintética (Tris, ácido cítrico y glucosa) sobre criosupervivencia celular en esperma de toro después de los procesos de congelación-descongelación y vitrificación-calentamiento.

### 2.3. Hipótesis

La suplementación de Jalea Real a diluyentes sintéticos y no sintéticos que incluyen yema de huevo (6%, v/v) permite incrementar la supervivencia celular basada en motilidad e integridad de las membranas espermáticas plasmática y acrosomal.



## 3. REVISIÓN DE LITERATURA

### 3.1. Criopreservación de espermatozoides bovinos

La criopreservación de semen bovino constituye una de las biotecnologías de gran importancia, buscando conservar el germoplasma masculino por tiempo indeterminado (Galarza et al., 2020). Se considera que esta biotecnología asociada a la inseminación artificial constituye un mecanismo eficiente para promover y difundir el material genético de alta calidad. Esta biotecnología a proporcionado una adecuada eficiencia en los hatos para el productor ganadero, debido a que se ha logrado reducir los costos tanto de alimentación, transporte de los reproductores y la transmisión de enfermedades sexuales transmisibles a las hembras bovinas (Ribeiro et al., 2014).

La conservación del semen bovino en nitrógeno líquido tiene como objetivo alargar la vida de las gametas masculinas, debido a que a temperatura ambiente los espermatozoides sufren una degeneración relativamente rápida, por el agotamiento de sus reservas energéticas (Murtary, 2021). El uso de semen congelado ha demostrado que acelera el progreso genético en diversas especies, pero principalmente en el ganado bovino (Arav et al., 2002). Además esta tecnología permite el establecimiento de bancos genéticos, mismos que ayudan a mantener la biodiversidad y conservación de una especie (Muiño , 2008).

Se conoce que uno de los factores más críticos para la supervivencia de las células después de la congelación, es evitar la formación de cristales de hielo a nivel de la célula, por medio de una deshidratación adecuada antes de colocarlos en nitrógeno líquido, lo que también está relacionado con la tasa de enfriamiento que permite un mayor flujo de agua intracelular, produciendo la degeneración de la estructura interna de la célula (Medina et al., 2007).

De acuerdo con la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida, congelación rápida con descongelación lenta, congelación

# UCUENCA

ultrarápida y vitrificación. La vitrificación se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo (Bravo, 2015).

## **3.2.1. Estrés oxidativo**

La vulnerabilidad de los espermatozoides de mamíferos al estrés oxidativo es en gran parte una consecuencia de su alta estructura anatómica especializada y composición bioquímica (Arata et al., 2005). A diferencia de la mayoría de las células somáticas, que poseen un abundante espacio citoplásmico en el que albergan su antioxidante, son susceptibles al ataque oxidativo porque contienen abundantes ácidos grasos poliinsaturados que los hace susceptibles a la peroxidación lipídica (Viada et al., 2017). Además, las proteínas y el ADN funcionalmente importantes están sujetos a modificación oxidativa, como el 4-hidroxi (4HNE), generado como consecuencia del proceso peroxidativo (Cordova, 2010).

## **3.2.2. Apoptosis de espermatozoides**

Para los espermatozoides, la apoptosis es una posición predeterminada en donde todos los espermatozoides están destinados a exhibir un programa vía de senescencia que tiene muchas similitudes con la cascada apoptótica intrínseca exhibida por células somáticas. La única vía por la cual un espermatozoide puede escapar a tal destino es fertilizar un ovocito y viceversa para el ovocito propenso a apoptosis (Aitken, 2014).

## **3.2. Diluyentes**

La principal función de los diluyentes o crio protectores es proteger a los espermatozoides de los procesos adversos de la refrigeración, congelamiento y descongelamiento, los diluyentes deben poseer propiedades de baja toxicidad para las células y una alta solubilidad en agua y tener capacidad amortiguadora para evitar cambios de pH, además de proporcionar nutrientes para el metabolismo de

# UCUENCA

los espermatozoides, controlar el crecimiento bacteriano y no deteriorarse durante el almacenamiento antes de su uso, el diluyente escogido debe ir de acuerdo a cada realidad y condiciones específicas de cada especie, con el fin de masificar la eficiencia reproductiva (Sherbiny, 2013).

También existen diluyentes con sustancias proteicas que actúan como crioprotectores extracelulares, tales como la yema de huevo, la albúmina sérica bovina, el suero equino, el suero bovino, la proteína de soya, el alcohol polivinílico y la leche descremada ultra-pasteurizada (Fernández, 2005).

## **Sustancias para mantener el pH y la capacidad tampón**

Las soluciones usadas son numerosas pero las de mayor uso son las mezclas de yema de huevo con tampón fosfato o citrato sódico y ajustadas a pH de 6,9 por adición de ácido cítrico. En 1972 se promovió la incorporación de TRIS a los diluyentes utilizados para preservar semen bovino, debido a que la combinación de Tris más yema de huevo y más glicerol favorecía la preservación de espermatozoides a temperaturas de 5°C como a -85°C (Muiño , 2008)

### **3.2.1. Diluyentes en base a Leche**

El uso de la leche como diluyente de semen data del año 1930 por parte de investigadores rusos. La fracción proteica de la leche es la responsable de las propiedades de la leche como diluyente, las cuales son: actuar como buffer ante cambios de pH, actuar como agente quelante, proteger los espermatozoides durante la reducción de temperatura. La leche entera, descremada o reconstituida, han sido utilizadas con previo calentamiento a 92-95°C por 8 a 10 minutos (no se debe hervir), con el fin de inactivar las lacteninas de la fracción proteica. La leche UHT es la más usada debido a que presenta la ventaja de no requerir calentamiento y ser estéril (Sherbiny, 2013)

## **3.2.2. Diluyente a base de yema de huevo**

Los fosfolípidos de la fracción lipoproteica de baja densidad (LDF) de la yema de huevo son los componentes que proveen protección a la membrana celular, mientras que las proteínas de esa fracción actúan estabilizando los lípidos y fijándolos a la membrana celular. Los fosfolípidos de la LDF fueron más efectivos en los estudios de almacenamiento de semen, respecto a la adición de fosfolípidos exógenos. No obstante, los liposomas de la lecitina, en contraste con los fosfolípidos de la LDF, proveen igual protección durante el choque de frío (Restrepo, 2013)

## **3.2.3. Diluyentes TRIS (hydroxymetil amino metano)**

El Tris es el principal componente estudiado de los diluyentes para almacenaje de semen, concentraciones de 10 a 50 mm presentan bajo o nulo efecto sobre motilidad y metabolismo del espermatozoide, este diluyente debe contener sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolaridad del medio (TRIS), una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (yema de huevo o leche desnatada) y una fuente de energía como fructosa o glucosa además de un crioprotector (Escobar, 2013).

## **3.3. Agentes crioprotectores**

Los crioprotectores, son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad, su finalidad es mantener la viabilidad celular durante un periodo determinado de tiempo protegiendo al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura. Existe una gran cantidad de compuestos que ejercen acción crioprotectoras sobre las células espermáticas, dividiéndose en agentes penetrantes o no penetrantes, según su acción sea intra o extracelular (García, 2016).

Los crioprotectores no permeables, son aquellos como azúcares, proteínas y lipoproteínas que se adicionan mediante el uso de productos naturales como la

# UCUENCA

yema de huevo y la leche. No atraviesan la membrana plasmática y se ubican en el espacio extracelular, modificando la membrana o disminuyendo la temperatura de congelación del medio (Ávila et al., 2006). Por el contrario, los crioprotectores permanentes producen una reorganización de los lípidos y proteínas de membrana, aumentando la fluidez y permitiendo el paso de agua, y la deshidratación celular que en los espermatozoides lleva a una disminución en la formación de hielo intracelular (García, 2014).

Son crioprotectores permanentes sustancias como el glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2 propanodiol, butanodiol, acetamida y DMSO (Holt, 2000). A lo largo del tiempo, se ha demostrado que el glicerol ha dado los mejores resultados, por lo que se lo considera como el crioprotector universal, y se lo utiliza en la mayoría de las especies domésticas, se lo utiliza en concentraciones entre el 3 y 9% ya que mayores puede resultar nocivo, causando fundamentalmente daños osmóticos en los espermatozoides (Amidi et al., 2016)

### **3.4. Aditivos: Jalea real (JR)**

La jalea real es un producto natural segregado por las glándulas hipofaríngeas (ácido 10-hidrodecenoico) y mandibulares (ácidos grasos, ácido 10-hidrodecenoico) de las abejas obreras (nodrizas) de 5 a 15 días de edad, pertenecientes a la especie *Apis Mellifera*. Las abejas obreras reciben jalea real hasta el tercer día de vida mientras que la reina la recibe durante toda su existencia, eso explica que tengan un tamaño mucho mayor a las obreras, que vivan 10-12 veces más, y que sean fértiles (Grosso et al., 2012).

#### **3.4.1. Composición química**

Al tratarse de una secreción animal, su composición es variable y depende de factores como: zona de procedencia, periodo de recolección (en verano hay incremento del ácido 10-hidrodecenoico- acción antibiótica) y naturaleza o edad de las larvas (abejas obreras jalea rica en proteínas). (Pérez & Jimeno, 1990)

# UCUENCA

La jalea real está compuesta por 60-70% de agua, 18 % de proteínas, entre el 10 y 17 % de azúcares, aproximadamente el 5,5% de lípidos y más del 1 % de sales minerales, además, contiene vitaminas del grupo B: B1, B2, B6, ácido nicotínico o vitamina PP, vitamina E, que estimula la actividad sexual, ácido pantoténico, biotina, inositol, ácido fólico un principio hiperglucemiante y factores antibióticos (Maghsoullou et al., 2019).

Agua		65,3%	
Residuo seco		34,7%	
Proteína		48,2% constituidas por Vitaminas	
Alanina	16%	A	1,10% mg/100g
Valina	3%	D	0,2%
Glicina	1,6%	E	5%
Isoleucina	3%	B1	2,06%
Leucina	3,9%	B2	2,77%
Prolina	2%	B6	11,905
Treonina	2,9%	B12	0,15%
Serina	3,75	Ac. Pantoténico	52,80%
Metionina	0,5%	PP	42,42%
Fenilalanina	2,8%	Ac. Ascórbico	2%
Ac. Aspático	8,3%	Ac. Fólico	0,40%
Ac. Glutámico	4,9%	Inositol	42%
tirosina	2,9%	Aminoácidos libres	
Lisina	3.3%	Alanina	1,7%
Arginina	3,4%	Valina	1,7%
Triptófano	Presente	Glicina	2,1%
Carbohidratos	37,8%	Isoleucina	1,3%
Lípidos	10,4%	Leucina	13,3%
Cenizas	2,0%	Prolina	139,8%

		Treonina	1%
		Serina	3,5%
		Ac. Amino-butírico	3,5%

**Tabla 1.** Composición química de la Jalea Real. Estudios bioquímicos, aplicando numerosas técnicas de identificación, han revelado la composición de la Jalea Real (Broto, 1989).

En un estudio, en donde evaluaron las características fisicoquímicas de la jalea real, llegaron a la conclusión de que la calidad de la jalea real depende de la forma de extracción y las condiciones de almacenamiento, en tanto que en parámetros fisicoquímicos son similares a los reportados por la mayoría de los autores (Salamanca et al., 2013).

En la JR, la materia seca es principalmente nitrogenada y está constituida por enzimas, péptidos y aminoácidos, siendo la prolina la más representativa debido a que esta disminuye cuando el producto se ha excedido en el tratamiento térmico (Sabatini et al., 2009).

La fracción lipídica está presente en concentraciones variables, pero representa el componente más importante de la jalea real (Olimpia et al., 2008). La porción lipídica está compuesta por los ácidos orgánicos libres, mismos que han atraído la atención de muchos investigadores, debido a sus características químicas, el 10-HDA (ácido 10-hidroxi-2-decanoico) es un inhibidor de grasa en la síntesis de lípidos y posee capacidad estrogénica (Nozaki et al., 2012).

### 3.4.2. Propiedades y usos

A la JR se le atribuyen capacidades antioxidantes, antibióticas, reguladores de la presión arterial, antitumorales, antibióticos y antiinflamatorios debido a su elevado contenido de ácido 10-hidroxi-2-decanoico que representa la fracción lipídica y es reconocido como parámetro de autenticidad, lo que permite mantener en óptimas condiciones la jalea real a pesar de las adversidades medioambientales

# UCUENCA

(Grosso et al., 2012). La jalea real generalmente es recolectada y vendida como suplemento dietético, debido a la inmensa cantidad de beneficios para la salud debido en su mayoría a sus componentes como las vitaminas del complejo B, el ácido pantoténico (vitamina B5) y la piridoxina (vitamina B6). Debido a su química y composición aún no se logran conocer completamente sus efectos a pesar de que es uno de los productos de las abejas más estudiados (Sherbiny, 2013)

En los últimos estudios se demostró que la jalea real contenía testosterona y actividades de tipo hormona esteroidea. Cuando la jalea real fue administrada como una solución al 10%, ya sea por vía intraperitoneal o a través de un tubo estomacal a ratas macho, estimulaba la producción de hormona luteinizante, testosterona y progesterona. La jalea real pudo contrarrestar la "infertilidad de verano" (mejoró significativamente una serie de parámetros de espermografía) y mejoró el estado fisiológico en conejos machos (Sanchez, 2003).

La producción de la jalea real implica un proceso especializado por lo cual una producción eficiente solo puede alcanzarse a través de la práctica, experiencia y la obtención implica simular las circunstancias en las cuales las abejas reinas son criadas naturalmente en la colmena (Gueguero, 2014).

### **3.4.3. Producción de jalea real**

La producción de jalea real implica un proceso especializado y exige un conocimiento profundo de las abejas y de su comportamiento, debido a los problemas que presentan que, son la elaboración de un volumen razonable a precio accesible y por otro lado la conservación del producto sin que pierda su valor biológico. En la producción de la jalea real existen diversos métodos para su recolección, entre los métodos más conocidos tenemos: Miller, Alley, Doollittle, Jenter o Nicot, siendo el método Doollittle el más usado por los pequeños y medianos apicultores (Reina , 2010).

#### **3.4.3.1. Método Miller**

Consiste en tomar un panal con larvas de menos de 24h de eclosionadas y realizar cortes transversales desde abajo hasta arriba del panal, la idea es que las



# UCUENCA

obreras seleccionen para reinas las larvas que quedan en los bordes. De este método se obtienen pocas celdas (Zúñiga , 2019).

### **3.4.3.2. Método Alley**

En este método se selecciona un panal con larvas de menos de 24h de eclosionada, luego se cortan tiras horizontales y se colocan las tiras en el borde de un panal con el lado de las larvas seleccionadas hacia abajo, aquí también se obtienen pocas celdas por panal (Aragón , 1958).

### **3.4.3.3. Método Jenter o Nicot**

Este método se trata de usar una jaula especial, en donde la reina no puede salir, pero si permite el paso de las obreras, de manera que se introduce la reina y se la obliga a poner en celdas artificiales. Con este método se obtiene hasta 100 celdas, pero se induce estrés a la reina (Zúñiga , 2019)

### **3.4.3.4. Método Doolittle**

A este método también se lo conoce como el método de “transferencia de larvas” o de “Copas Celdas Artificiales”; este método consiste en trasladar las larvas de 24h de eclosionadas a celdas artificiales para realizar la crianza de reinas o producción de jalea real. Para llevar a cabo este método es necesario tener colmenas fuertes y en estado óptimo que incentive la aceptación y la construcción de celdas reales (Sarh, 1990).

### **Copas celdas de plástico**

La mejor opción son usar copa celdas de plástico porque permite un uso indefinido, ya que realizar copaceldas de cera en cada traslarve implica mayores gastos en mano de obra y materiales (Pickard & Kither , 1983).

### **Colmena criadora**

Son dos cámaras de crías, en la cámara inferior se mantiene a la reina con la cría operculada y en la segunda se encuentra el alimento y la cría sin opercular, la reina no tiene influencia en la cámara superior (Sarh, 1990).

## **Colmena iniciadora**

Consiste en una colmena huérfana (sin reina) de al menos 24 horas, en caso de que existan celdas realeras estas deben ser destruidas para que no exista competencia y se podrá introducir el marco de traslarve. Esta colmena se encargara de la construcción de las celdas realeras y la aceptación de las larvas transferidas, 24 horas después de la aceptación se traslada a la colmena criadora (Zúñiga , 2019).

## **Traslarve**

Es la transferencia de la larva de 1 a 3 días de edad, a las celdas artificiales donde serán alimentadas por las abejas nodrizas. Larvas mayores de 3 días ocupan mayor espacio en la celda por ende la cantidad de jalea real será reducida, es por esto que en su mayoría las larvas no deben ser mayores a 3 días de nacidas (Aragón, 1958; Zúñiga 2019).

## **Sustrato para traslarve**

Según un estudio realizado por (Pickard & Kither , 1983), para que se produzca una aceptación de los traslarves se debe usar jalea real fresca diluida en agua (dilución 1:1). Debido a que el sustrato proporciona la suficiente humedad para evitar la deshidratación de la larva después del traslarve, de igual forma mejora la aceptación por parte de las abejas obreras (Contreras et al., 2017).

### **3.4.4. Factores que inciden en la producción**

#### **3.4.4.1. Crecimiento y tamaño de la colmena.**

La disminución del espacio debido al crecimiento poblacional hace las abejas enjambren, de igual forma ocurre durante la época de verano donde hay mayor oportunidad de alimento y esto a su vez aumenta la probabilidad de que exista presencia de celdas realeras y éstas son abastecidas con suficiente alimento larval (Broto, 1989).

## **3.4.4.2. Alimentación**

Se basa netamente en néctar y polen ayudando a su vez a que exista un adecuado desarrollo de las glándulas hipofaríngeas y de su cuerpo, el suplemento con jarabe también ayuda en el proceso de producción de jalea real (Grosso et. al., 2012)

## **3.4.4.3. Estacionalidad**

Los cambios climáticos influyen directamente sobre los recursos florales afectando la densidad de la población o tasas de crecimiento. Además, las variaciones en la temperatura y las elevaciones en la humedad contribuyen a generar el ambiente adecuado para los patógenos que producen enfermedades como Ascosferosis y Nosemosis que se desarrollan en condiciones de alta humedad. Para obtener mejores resultados es recomendable realizar esta actividad durante la época de verano o en climas tropicales (Zúñiga , 2019)

## **3.5. Almacenamiento de esperma bovino líquido (refrigeración)**

La conservación de semen bovino en fresco se la realiza a temperaturas entre 15-20°C o entre 4-5°C. Mediante la conservación a 5°C, se disminuye la actividad metabólica de los espermatozoides y se produce una reducción en el crecimiento bacteriano, llevando al eyaculado a extender su supervivencia (Vishwanath & Shannon , 2000). Es posible la implementación de semen refrigerado a 5°C ya que la vida útil es de 2 a 4 días lo que facilita su transporte, el semen almacenado a 5-8°C sobrevive entre 24-48 horas sin una disminución significativa en la motilidad y hasta 96 horas sin un marcado descenso en el porcentaje de fertilidad (Lema , 2011).

La mayor ventaja del semen refrigerado, motivo por el cual esta tecnología se encuentra en utilización cada vez en más países, es el bajo número de espermatozoides utilizados por dosis inseminante. Por otro lado, su principal desventaja es su vida útil limitada, con la imposibilidad de almacenar las muestras por largos periodos (Vishwanath & Shannon , 2000).

## 3.6. Métodos de congelación

La criopreservación de semen es una biotecnología que busca promover la conservación del germoplasma por tiempo indefinido y asociado a la inseminación artificial representan un mecanismo eficiente para promover y difundir el material genético de alta calidad. El éxito de la criopreservación del semen depende de factores como la calidad del semen la composición del diluyente, el crioprotector, el enfriamiento, la dosificación, la descongelación, la variabilidad individual y la interacción de estos componentes (Ribeiro, 2013).

La criopreservación produce diferentes tipos de estrés especialmente causados por el frío como es el estrés osmótico y oxidativo, peroxidación lipídica y formación de cristales de hielo lo que conlleva a una reducción de la fertilidad y con ello afectan a las estructuras de la membrana celular, funciones de las mitocondrias, fragmentación del ADN y potencial de membrana específicamente su integridad debido a la disminución de la temperatura lo que favorece a la formación de hielo aumentando la concentración de solutos en el diluyente deshidratando a los espermatozoides (Rubio et al., 2009).

Los métodos de criopreservación son: la congelación lenta, la congelación rápida y la congelación ultrarápida (vitrificación cinética).

### 3.6.1. La congelación lenta:

Permite a los espermatozoides un enfriamiento progresivo en un periodo de 2 a 4 horas, este tipo de congelación favorece a la formación de cristales de hielo debido a la gran cantidad de electrolitos que quedan dentro de las células lo que conduce a un mayor daño físico-químico de los espermatozoides, es por ello que el descenso de la temperatura debe ser controlado para favorecer el acoplamiento del crioprotector para reducir los daños (Restrepo et al., 2012)

# UCUENCA

## **3.6.2. La congelación rápida**

Es aquella en donde los espermatozoides son mezclados con el crioprotector para posteriormente ser cargados en las pajuelas y exponer rápidamente a vapores de nitrógeno y sumergirlas por un tiempo no mayor a 10 minutos (Gadea , 2003).

## **3.7. Congelación convencional (lenta) con vapores de nitrógeno líquido**

Esta técnica consiste en la adición de un diluyente a la muestra espermática mismo que contiene un crioprotector que puede ser permeable y no permeable, cuya función de prevenir al espermatozoide de factores dañinos como es la formación de cristales de hielo intracelular además de reducir las alteraciones osmóticas, el crioprotector es el encargado de desplazar o extraer el agua del citoplasma celular evitando la formación de hielo intracelular. La reducción de la temperatura es controlada y dura entre 1-4 horas (Muiño , 2008).

La congelación lenta está influenciada por: la concentración de solutos, la presencia de solutos permeable y no permeables y la temperatura y es debido a estos factores que el espermatozoide presenta motilidad y vitalidad reducida post-descongelamiento. Además se observa daños en la membrana plasmática, espermática y acrosomal (Llanos & López , 2019). Las células criopreservadas se almacena a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido lo que evita que existan reacciones químicas (Fernández et al., 2009)

El periodo por el cual el semen puede mantenerse congelado es ilimitado, favoreciendo de esta manera el comercio nacional e internacional. La congelación es la técnica de elección para conservación del semen pese a que el espermatozoide sufre daños sobreviviendo a esta etapa solo el 50-60% de los espermatozoides (Watson , 2000)

## **3.8. Vitrificación cinética**

La vitrificación se basa en la congelación rápida de una solución con alta concentración de crioprotectores, la que a bajas temperaturas aumenta la viscosidad sin la formación de cristales de hielo. En este estado el agua se solidifica, pero no se expande, lo que sucede gracias a un rápido enfriamiento, conduciéndose

así a un aumento extremo en la viscosidad sin cristalización intracelular (Arestegui et al., 2017).

La vitrificación, permite la criopreservación de espermatozoides sin necesidad de crioprotectores permeables. Este método se realiza por el contacto directo entre las gotas de dilución con espermatozoides y el nitrógeno líquido, permitiendo un proceso de enfriamiento ultrarrápido (Canteras, 2019).

El éxito de la vitrificación depende de: 1. la velocidad de enfriamiento y calentamiento, 2. La viscosidad y 3. Volumen de la muestra (Arav et al., 2002). La velocidad de enfriamiento y calentamiento debe ser ultrarápida y puede llegar a miles de °C/min ya que se debe evitar la nucleación del hielo y la cristalización que provocan daños en la célula (Gao & Critser, 2000). En cuanto al volumen de la muestra, cuanto menor sea, mayor probabilidad de vitrificación, volúmenes pequeños permiten una mejor transferencia de calor y facilitan mayores velocidades de enfriamiento (Arav, 2014).

### **3.9. Análisis de calidad espermática (CASA y Fluorescencia)**

#### **3.9.1. Sistema computarizado de Análisis Seminal (CASA)**

El sistema Computarizado de Análisis Seminal (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA, por sus siglas en inglés), El sistema involucra una cámara de video conectada a un microscopio de interfase y a una computadora que digitaliza las imágenes del tamaño y de los movimientos espermáticos. Las imágenes digitalizadas a través del tiempo permiten analizar la velocidad de las células, el movimiento rectilíneo, circular o lateral. Es un sistema internacionalmente conocido por ser un equipo rápido, certero, constante y científicamente validado (Muiño , 2008).

El equipo CASA permite el cálculo del conteo total de una muestra seminal, la cantidad de espermatozoides móviles y la concentración, así como también todos los valores de velocidad, movimiento lateral, progresivo y linealidad de la trayectoria espermática (Aguero , 2012)

# UCUENCA

Se utiliza para determinar con mayor exactitud la motilidad espermática post descongelación y su vitalidad, es muy útil para determinar el número de espermatozoides/dosis de inseminación, dado que los espermatozoides de toro luego de ser sometidos a la criopreservación sufren una alta mortalidad, lo que compromete la fertilidad, y la calidad del espermatozoide después de la descongelación (Bravo, 2015).

## 3.9.1.1. Parámetros por evaluar en el sistema CASA

- **Velocidad curvilínea (VCL):** velocidad promedio de desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real, medida en  $\mu\text{m}/\text{seg}$ .
- **Velocidad rectilínea (VSL):** velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta, desde la primera hasta la última posición, medida en  $\mu\text{m}/\text{seg}$ .
- **Velocidad promedio de desplazamiento (VAP):** velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio, medida en  $\mu\text{m}/\text{seg}$ .
- **Porcentaje de linealidad (LIN):** relación (%) entre VSL y VCL.
- **Índice de rectitud (STR):** relación (%) entre VSL y VAP.
- **Índice de oscilación (WOB):** relación (%) entre VAP y VCL.
- **Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH):** valor promedio, de desplazamiento lado a lado de la cabeza, en cada ciclo de batido, medida en  $\mu\text{m}$ .
- **Frecuencia de batido (BCL):** frecuencia con la cual la verdadera trayectoria del espermatozoide cruza la trayectoria promedio, medida en Hz (Ximénez , 2017).

## 3.9.2. Evaluación seminal mediante técnicas fluorescentes

El descubrimiento de fluorocromos y compuestos conjugados a sondas fluorescentes, ha permitido mejorar el análisis de los atributos de los

# UCUENCA

espermatozoides, actualmente el uso de estas sustancias fluorescentes de alta especificidad en el análisis de semen en donde se utilizan moléculas que permiten valorar el estado de la membrana plasmática (Gil et al., 2010).

Los colorantes más comunes son el SYBR-14 y el ioduro de propidio, rodamina 123, naranja de acridina y Hoescht 33342 (Gillan et al., 2005). El SYBR-14 tiñe el DNA de los espermatozoides viables de color verde brillantes, mientras que el ioduro de propidio penetra en los espermatozoides no viables y los tiñe de color rojo brillante. La valoración de los espermatozoides viables y no viables se realiza mediante un microscopio de fluorescencia aplicando la citometría de flujo (Quintero et al., 2017), permitiendo evaluar características de integridad, vitalidad y función de los espermatozoides (Garner et al., 1983).

### **3.9.2.1. Análisis de viabilidad espermática**

El estudio de la viabilidad espermática se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante el uso de dos fluorocromos combinados en donde el uno es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, lo que permite identificar células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el otro es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por lo tanto identifica poblaciones de células viables (Garner et al., 1988).

El ioduro de propidio (PI) es el más usado para identificar células muertas, debido a que penetra en espermatozoide con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo, y al ser excitado por la longitud de onda apropiada (510-560 nm) emite fluorescencia roja (Garner et al., 1986).

### **3.9.2.2. Análisis de integridad acrosomal**

La integridad acrosomal puede ser evaluada mediante diversos procedimientos, pero cuando se usa la citometría de flujo como método de análisis, el más común es el uso de lecitinas conjugadas con un fluorocromo. Entre las lecitinas disponibles comercialmente encontramos la PNA (peanut agglutinin), que se une a la membrana acrosomal interna del espermatozoide y la PSA (pisum sativum agglutinin) que se une a la matriz acrosomal y a la membrana acrosomal externa. El uso de lectinas



# UCUENCA

conjugadas con un fluorocromo como la fluoresceína (FITC) permite detectar a los espermatozoides con membrana acrosomal dañada, lo que posibilita la entrada de la lecitina y por lo tanto del fluorógeno, lo que posibilita el paso de la lecitina y por ende el fluorógeno al interior del compartimento acrosomal observándose al microscopio de color naranja (Muiño , 2006).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Producción de jalea real

- Colmenas
- Marcos de cera
- Ahumador
- Vestimenta de apicultor
- Copaceldas artificiales
- Marco para traslarve
- Agujas de traslarve
- Alimento (azúcar, agua, ML, propóleo, JR)
- Recipientes color ámbar
- Cooler
- Bisturí
- Papel aluminio
- Espátulas
- Guantes de caucho y de látex
- Botas de caucho

#### 4.1.2. Elaboración de diluyentes

- Refrigerador
- Microscopio
- Pajuelas
- Vagina Artificial

# UCUENCA

- Tubos falcon de 15ml
- Papel aluminio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Recipientes
- Baño María
- Centrifuga
- Guantes de examinación
- Tubos eppendorf
- Pipetas automáticas
- Puntas de pipetas
- Vasos de precipitación
- Equipo de calentamiento

## 4.1.3. Materiales biológicos

- Toros
- Semen
- Abejas
- Jalea real

## 4.1.4. Reactivos

- Diluyente sintético: TCG (Tris, ácido cítrico y glucosa)
- Diluyente no sintético: UHT: (leche desnatada, penicilina y estreptomicina)
- Nitrógeno líquido
- Glicerol
- Sucrosa
- HEPES (Fluorescencia/ Salt, NaCl, KOH, glucosa, agua destilada)
- Yoduro de propidio (yoduro, PBS)
- Aglutinina (PBS, BSA)

## 4.2. Área de estudio

El área de estudio estuvo ubicada en Ecuador, provincia de Azuay, Cantón Cuenca, dentro de las parroquias Victoria de Portete (Irquis) y Baños (Nero) en las haciendas de Irquis y Nero ambas pertenecientes a la Universidad de Cuenca. Mismas que se encuentran ubicadas a 2700msnm (Irquis) y 3200msnm (Nero). La cosecha de la jalea real se realizó en la Granja de Nero, y en los análisis de muestras de semen se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal ubicado en la Granja de Irquis, de la misma Universidad de Cuenca.

## 4.3. Elaboración de diluyentes y medios.

Para este estudio se usó medios elaborados en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal. Los reactivos para la elaboración de medios son de Sigma-Aldrich y Merk.

**Tabla 2.** Diluyente UHT (para refrigeración)

Componente	Cantidad
Leche desnatada UHT ( <i>ultra high temperature</i> )	188 ml
Yema de huevo desactivada (incubación a 56°C por 30 minutos)	12 ml
Penicilina	200,000 IU
Estreptomicina	200 mg

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 300 a 320 mOsm/kg

El primer diluyente de base no sintética “UHT” fue elaborado según lo descrito por (Galarza, López, & Santiago, 2020) y se usó para refrigeración del semen bovino. Para este propósito se usó leche desnatada comercial tratada con altas temperaturas (*ultra high temperature*) y se adicionó el 6% (v/v) de yema de huevo inactivada. La inactivación se realizó exponiendo la yema de huevo a un incubador regulado a 56°C durante 30 minutos. El diluyente fue centrifugado a 4000 × g durante 20 minutos a temperatura ambiente y entonces recuperado el

# UCUENCA

sobrenadante. Posteriormente, el diluyente centrifugado fue medido pH y osmolaridad que osciló entre 6,8 a 7,2 y 300 a 320 mOsmol/kg, respectivamente. Finalmente, el diluyente fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso (Tabla 1).

**Tabla 3. Diluyente TCG-YH (para congelación y vitrificación)**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
TRIS (gramos)	3,8
Ácido cítrico (gramos)	2,2
Glucosa (gramos)	0,6
Estreptomicina (gramos)	0,08
Penicilina (gramos)	0,08
Agua destilada (Pura, ósmosis)	100 ml
Yema de Huevo (ml)	6% = 6 ml
Glicerol (GLY) ml para CONGELAR	5%
Sacarosa (gramos) para VITRIFICAR	100 mM = 3,42

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 300 a 320 mOsmol/kg

El segundo diluyente formulado de base sintética “TCG” fue elaborado según lo descrito por (Galarza, López, & Santiago, 2020), con algunas modificaciones y se usó para congelación y vitrificación del semen bovino. Para este propósito se formuló el medio sintético TCG (tris, ácido cítrico y glucosa) y se adicionó el 6% (v/v) de yema de huevo inactivada tal como se detalla en la **Tabla 2**. El diluyente base fue centrifugado a  $4000 \times g$  durante 20 minutos a temperatura ambiente y entonces recuperado el sobrenadante. Posteriormente, el diluyente centrifugado fue medido el pH y la osmolaridad que osciló entre 6,8 a 7,2 y 300 a 320 mOsmol/kg, respectivamente. A este diluyente se le agregó 5% de glicerol o 100 mM de sucrosa ya sea para congelar o vitrificar espermatozoides bovinos, respectivamente. Finalmente, el diluyente fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso.

**Tabla 4. Medio HEPES para fluorescencia**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Hepes salt	476,62 mg
NaCl	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua destilada	100 ml

Alicuotar en dosis 250 uL en tubos eppendorf y congelar a -20 °C hasta su uso

**Tabla 5. Yoduro de propidio**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Yoduro de propidio	1 mg
PBS	1 ml

Alicuotar en dosis de 50 uL y almacenar a -20°C

**Tabla 6. Aglutinina**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
PNA-FITC aglutinina	0,2 mg
BSA	5 mg
PBS	1 ml

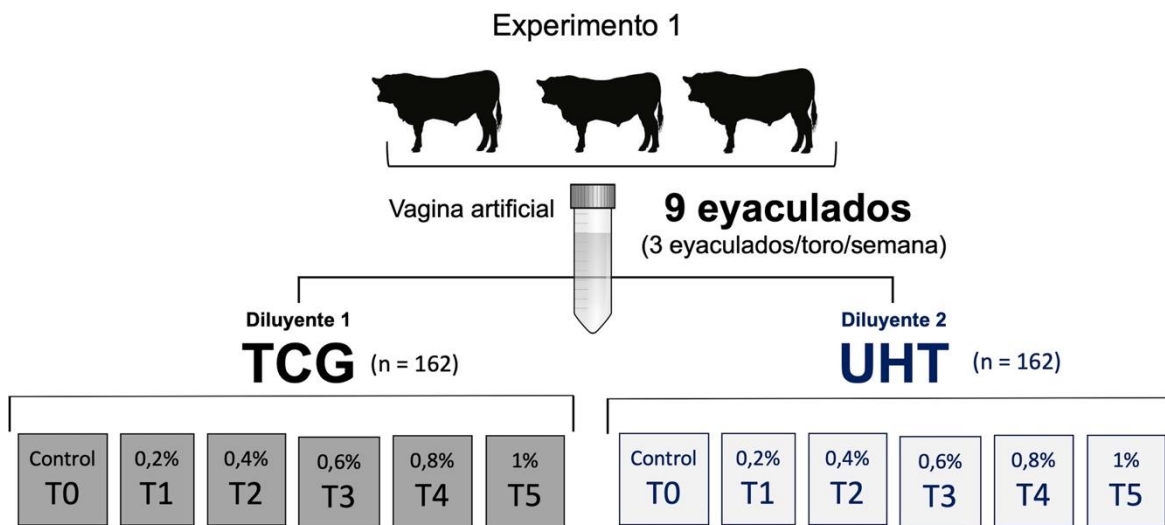
Alicuotar en dosis de 50 uL y almacenar a -20°C

#### **4.4. Diseño experimental**

Esta investigación incluyó dos experimentos. El Experimento 1 determinó la concentración más adecuada de JR suplementado dos diluyentes, un de base sintética TCG-YH (tris, ácido cítrico, glucosa, 6% yema de huevo), y otro de base no sintética UHT (leche descremada tratada con ultra calor más 6% de yema de huevo). Para este propósito, se recolectó 9 eyaculados de semen de 3 toros adultos (una colecta semanal por toro; 3 eyaculados /semana). Cada eyaculado se dividió en 2 grandes fracciones. La primera fracción se dividió en 6 alícuotas que fueron

# UCUENCA

diluidas con TCG-YH y suplementados con jalea real a una concentración final de 0% (T0, control); 0,2% (T1-TCG); 0,4% (T2-TCG); 0,6% (T3-TCG); 0,8% (T4-TCG) y 1% (T5-TCG). De la misma manera, la segunda fracción se dividió también en 6 alícuotas que fueron diluidas con UHT y suplementados con jalea real a una concentración final de 0% (T0, control); 0,2% (T1-UHT); 0,4%(T2-UHT); 0,6%(T3-UHT); 0,8% (T4-UHT) y 1% (T5-UHT) (Fig. 2). Todos los tratamientos fueron refrigerados a 5°C y evaluadas sus características cinéticas a las 0, 48 y 96 horas. En total se analizaron 162 muestras de cada diluyente y 27 muestras por cada tratamiento.



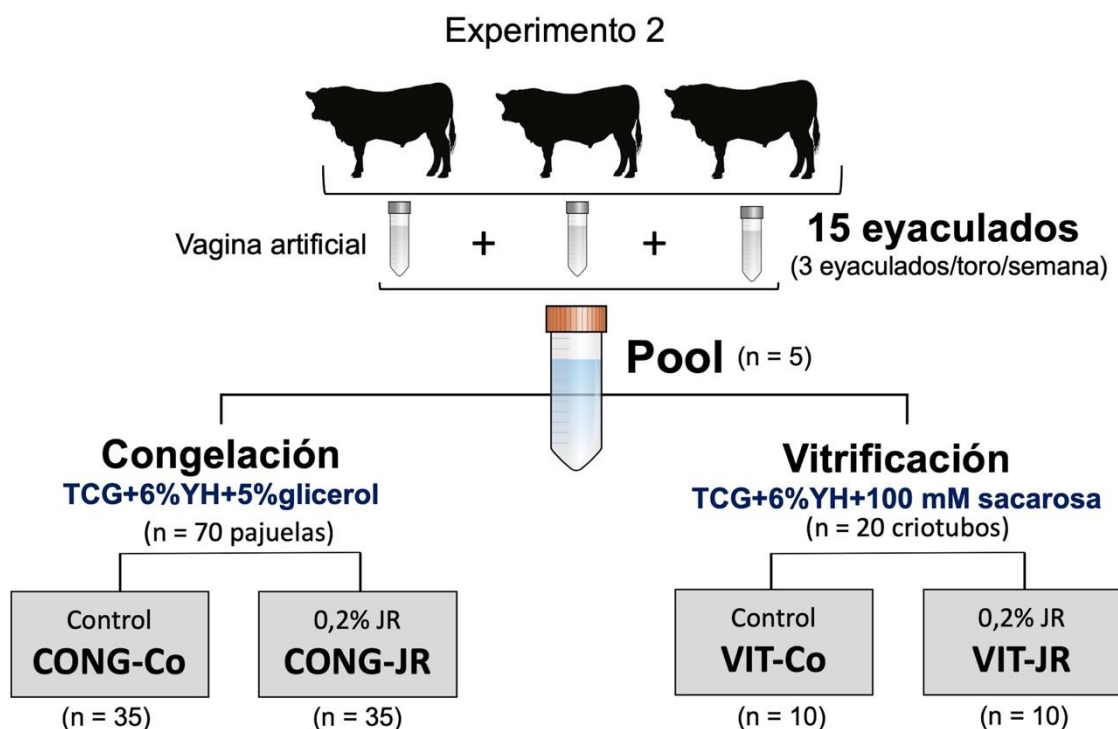
**Figura 2.** Concentración de JR suplementado en dos diluyentes, uno de base sintética TCG-YH, y otro de base no sintética UHT (leche descremada tratada con ultra calor más 6% de yema de huevo).

El experimento 2 involucró la concentración óptima de JR obtenida en el experimento 1 (0,2%) y fue usado para determinar el efecto sobre congelación y vitrificación de espermatozoides bovinos. Para este propósito se recolectó 15 eyaculados de semen de 3 toros (una colecta semanal por toro; 3 eyaculados / semana). En cada sesión, se conformó una agrupación (pool) con los tres eyaculados de toro. En total se conformaron 5 pools de eyaculados. Cada Pool fue dividido en 2 alícuotas grandes para ser usadas en congelación (n = 70) y en

# UCUENCA

vitrificación (n = 20 criotubos con 20 pellets cada uno) de semen bovino. En este experimento se conformaron cuatro tratamientos. El diluyente base usado para ambos métodos de criopreservación fue el TCG-YH. Para la congelación se usó el glicerol al 5% y para la vitrificación se usó sacarosa a 100 mM. En total se conformaron 4 grupos (Fig. 3): Congelación control (CONG-Co); Congelación con 0,2% jalea real (CONG-JR); Vitrificación control (VIT-Co); y Vitrificación con 0,2% jalea real (VIT-JR).

Las muestras congeladas y vitrificadas fueron descongeladas, calentadas respectivamente y analizadas su cinemática, la integridad de membranas plasmática y acrosomal.



**Figura 3.** Experimento 2. Concentración óptima de RJ para congelación y vitrificación

# UCUENCA

## 4.5. Metodología

### 4.5.1. Producción de jalea real

**Familiarización:** Es indispensable que las copaceldas sean introducidas en la colmena criadora al menos 24 horas antes del traslarve, para que las abejas nodrizas impregne sus feromonas al limpiarlas con su lengua y no exista rechazo.

**Distribución:** Cada colmena estuvo compuesta por 10 panales en la cámara de producción distribuidos de la siguiente manera: 1 marco de traslarve (en medios de los marcos con cría abierta), 2 marcos con alimento (en los extremos), 2 marcos con cría abierta y 5 marcos con cría operculada (nuevas nodrizas). Recordemos que la reina no se encuentra en esta colmena. El marco especial está compuesto por 2 listones con 20 celdillas reales por listón.

**Traslarve:** Después de haber orfanizado la colmena, se realizó la transferencia de larvas, misma que se lleva a cabo en un lugar aislado de las abejas se puede instalar una tienda de campaña para mayor comodidad. Una vez concluida la preparación se tomó de la colmena el marco aromatizado que fue colocado un día anterior y con la ayuda de un pincel colocamos en el fondo de la copacelda una gota del sustrato diluido (JR: AGUA). Se extrae cuidadosamente la larva seleccionada y la colocamos en la misma posición en la copacelda, se debe evitar que se voltee, porque se puede provocar obstrucción de los espiráculos y no pueda respirar. Después de realizado el traslarve, colocamos el marco en el lugar designado y después de 3 días realizamos la extracción de jalea real.

**Recolección:** Transcurridos los 3 días extraemos el marco con las copaceldas y con ayuda de un bisturí retiramos los excesos de cera, sacamos la larva con una pinza de acero inoxidable o plástico y finalmente extraemos la jalea real (150 a 250mg por celdilla aproximadamente) con una espátula de acero inoxidable o plástico y la almacenamos en un recipiente color ámbar o cubierto con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. La extracción se realizó con estrictas normas de higiene, procurando evitar el contacto con polvo y objetos sucios o



# UCUENCA

contaminados. La extracción se efectúa bajo mosquiteros o redes especiales para evitar el ingreso de insectos.

**Almacenamiento:** se lo debe hacer a temperatura de 4°C hasta -20°C, para prevenir la degradación proteica y enzimática sin sufrir alteraciones significativas (Li, Wang , & Peng, 2007). Cabe recalcar que la jalea real es sensible a la luz y a los cambios de temperatura por lo que se debe mantener la cadena de frio desde su extracción hasta su uso.

## 4.5.2. Reproductores y recolección de semen

El proceso de recolección de semen se realizó en 3 toros adultos, clínicamente sanos y sexualmente activos, de 1 a 5 años de edad. Los toros estuvieron libres de enfermedades infecciosas tales como la brucelosis, tuberculosis, leptospirosis, IBR, DVB, Parainfluenza, Tricomoniases y Neosporosis, según los registros sanitarios disponibles en las granjas. Estos reproductores estuvieron alojados en las granjas bajo un sistema de pastoreo rotacional y su dieta basal constó de *Pennicetum clandestinum* (Kikuyo) y *Ryegrass* con mayor predominio 60-75% y *trifolium patense* (Trébol rojo) y *trifolium repens* (Trébol Blanco) y algunas otras gramíneas de menor valor nutritivo (Guevara et al., 2017).

Previo al Experimento 1, los toros tuvieron un entrenamiento de 1 mes para el salto y recolección de semen con vagina artificial. En ambos experimentos (1 y 2), el proceso de recolección de semen se realizó semanalmente (1 eyaculado / semana / toro) usando una vagina artificial (VA) rígida. La VA fue armada, lubricada y acondicionada a una temperatura entre 42°C y 45°C, de tal modo que al momento de la colecta se encuentre entre 38 a 39°C. Previo a la recolección, se realizó un lavado del pene con suero fisiológico precalentado a 37°C. La recolección del semen se realizó en una vagina artificial (IMV, Francia). Inmediatamente después de la recolección, cada eyaculado fue pre-diluido en una fracción 1:1 con cada diluyente (37°C) base según sea el experimento. Inmediatamente las muestras fueron transportadas a 37°C hasta el Laboratorio de Biotecnología de la

Reproducción Animal (en menos de 30 minutos) para su análisis inicial subsiguiente y procesamiento.

### 4.5.3. Experimento 1. Determinación de la concentración óptima de JR

En el laboratorio, el primer análisis consistió en la determinación de la concentración usando un hemocitómetro (Minitibe, Alemania). Consecuentemente, la motilidad inicial, así como los parámetros cinéticos fueron medidos en el sistema CASA (ver sección motilidad)

Cada fracción de muestra pre-diluida 1:1 de cada diluyente (TCG y UHT) fueron diluidas con las diferentes dosis de JR a una concentración final de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/mL. El Experimento 1 incluyó 6 tratamientos por diluyente que se detallan a continuación (Tabla 6):

**Tabla 6. Tratamientos del Experimento 1**

Diluyente	Control	Concentración de Jalea Real (v/v)				
	0 %	0,2%	0,4%	0,6%	0,8%	1%
UHT (n=162)	T0-UHT	T1-UHT	T2-UHT	T3-UHT	T4-UHT	T5-UHT
TCG (n=162)	T0-TCG	T1-TCG	T2-TCG	T3-TCG	T4-TCG	T5-TCG

Cada muestra fue almacenada a 5°C durante 96 horas y las evaluaciones de cinética espermática fueron evaluadas a las 0, 48 y 96 h de almacenamiento.

### 4.5.4. Experimento 2. Efecto de la jalea real en semen bovino congelado y vitrificado

Este experimento fue realizado con la concentración optimizada de jalea real determinada en el Experimento 1. La dosis de JR que se usó en este segundo experimento fue al 0,2%.

De la misma manera que el Experimento 1, el semen recolectado con VA fue pre-diluido 1:1 con el diluyente sintético TCG-YH. En el laboratorio se determinó la concentración espermática de cada eyaculado y se crearon los pools. Cada pool estuvo conformado por la agrupación de los tres eyaculados de los toros. Se

# UCUENCA

determinó la motilidad inicial y luego el pool se dividió en dos alicuotas grandes para ser diluida con los diluyentes de congelación (TCG-EYH + 5% glicerol) y vitrificación (TCG-YHYH + 100 mM sucrosa), respectivamente con la adición de 0,2% de JR, a una concentración final de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Este experimento tuvo 4 tratamientos:

- CONG-Co (congelación control)
- CONG-JR (congelación con JR)
- VIT-Co (Vitrificación control)
- VIT-JR (Vitrificación con JR)

## 4.5.5. Congelación

Para la congelación, las muestras fueron mantenidas durante 3 horas a 5°C para su equilibrio y entonces cargadas en pajuelas de 0,25 mL y selladas. El protocolo de congelación se realizó mediante vapores de  $NL_2$  estático colocando las pajuelas equilibradas en el rack de una manera horizontal a una altura de 5 cm del nivel del  $NL_2$  durante 10 minutos y luego sumergiéndolas dentro del  $NL_2$ . La descongelación se realizó a partir del mes de almacenamiento y se realizó sumergiendo las pajuelas en un baño maría a 37°C durante 30 segundos. Las muestras congeladas-descongeladas fueron evaluadas su cinética e integridad de las membranas espermáticas.

## 4.5.6. Vitrificación

Para la vitrificación, las muestras fueron mantenidas durante 30 minutos a 5°C para su equilibrio y entonces se dejaron caer libremente al  $NL_2$  con la pipeta gotas de 30  $\mu$ L a una altura de 15 cm. Los pellets se formaron instantáneamente al entrar en contacto con el  $NL_2$  y se sumergieron consecuentemente. Los pellets fueron guardados en criotubos debidamente identificados. El calentamiento de los pellets se realizó en el equipo STC-3008, en donde se colocó directamente los pellets en las platinas térmicas a 65°C y las muestras derretidas instantáneamente fueron recolectadas en un vaso precipitación de 10ml y con la ayuda de una pipeta

automática se colocó la muestra en 2 tubos ependorf y se centrifugo a 300g durante 5 minutos. Se obtuvo el pellet y se diluyó en 200ul de TCG y de esto se colocó una gota en un portaobjetos y se analizó en el sistema CASA. Las muestras congeladas-descongeladas fueron evaluadas su cinética e integridad de las membranas espermáticas.

## **4.5.7. Análisis de calidad espermática**

### **4.5.7.1. Cinética espermática**

Las características cinéticas de las muestras de esperma bovino fresco, refrigerado, congelado-descongelado y vitrificado-calentado fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, v6.0.4 software, Microptic S.I., Barcelona, Spain) acoplado a un microscopio Nikon (Eclipse model 50i, contraste negativo) de contraste de fases de acuerdo a Galarza et al. (2018). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de esperma a 10X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/segundo). Para la evaluación se tomó 5 µL de la muestra a analizar (recomendable a una concentración de  $15 \times 10^6$  espermatozoides/mL usando el mismo diluyente) y se colocó en un porta y cubreobjetos. Las variables cinéticas evaluadas son: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, um/s), velocidad rectilínea (VSL, um/s), velocidad promedio (VAP, um/s), Linealidad (LIN, %), Rectitud (STR, %), Oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, um).

### **4.5.7.2. Integridad de membranas espermáticas**

Para la evaluación de las membranas, se descongeló la dosis del medio Hepes (250 µL). Se preparó la tinción de fluorescencia mezclando una dosis (50 µL) de yoduro de propidio (PI) más una dosis de PNA-FITC aglutinina (50 µL) y se cubrió de la luz con papel aluminio hasta su uso. Al medio Hepes descongelado temperado

# UCUENCA

a temperatura de cuarto se adicionó la muestra de esperma a analizar alcanzando una concentración de  $10 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Sin luz, se agregó 5  $\mu$ L de la mezcla de fluorescencia (PI+PNA-FITC) a dicha mezcla, y entonces, se tomó 5  $\mu$ L de esa muestra y se colocó en un porta y cubreobjetos para ser evaluado en el microscopio de fluorescencia (Galarza et al., 2018). La viabilidad de los espermatozoides y el estado de la membrana acrosómica se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (contando 200 células), utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.). La prueba de fluorescencia PI / FITC-PNA proporciona para cuatro subcategorías: porcentajes de esperma con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA, %), con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA, %); con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA, %); y con membrana plasmática y acrosoma dañados (DPDA, %) (Ugarelli, Evangelista, & Santiani, 2017).

## 4.6. Análisis estadístico

Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una base en Excel y posteriormente se analizó estadísticamente en un software STATISTICA versión 12.0. Los datos fueron expresados en media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística Shapiro Wilk para determinar la normalidad de datos. Las variables porcentuales y numéricas que no cumplieron una distribución normal fueron transformadas a *Arcoseno* y *Log-10*, respectivamente.

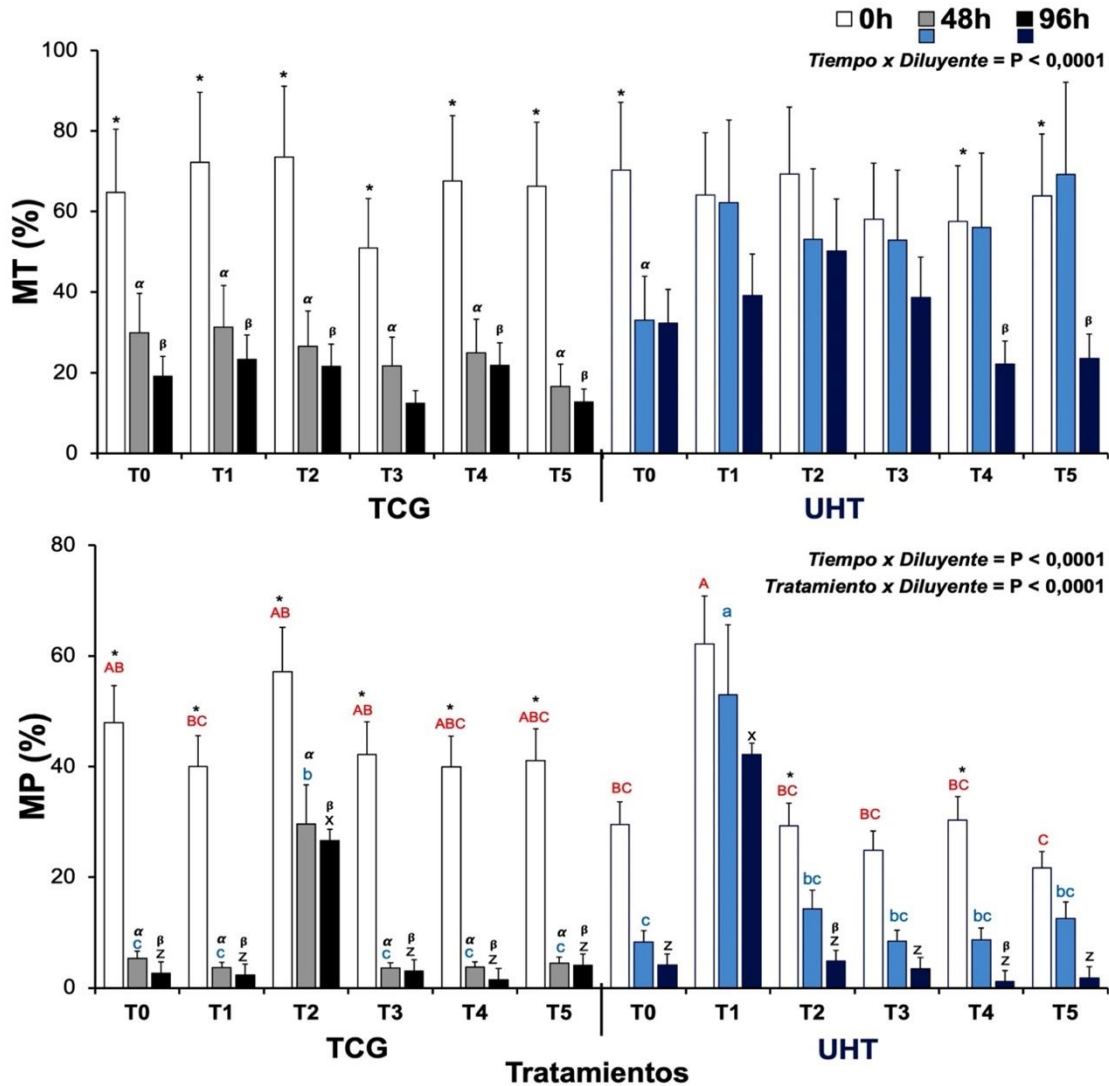
El análisis estadístico incluyó un modelo lineal general (GLM) para demostrar el efecto de la JR en ambos diluyentes bajo condiciones de criopreservación. El Experimento 1 se usó un ANOVA de medidas repetidas y la prueba post-Hoc de comparación múltiple de Bonferroni considerando el “*tipo de diluyente*” y el “*toro*” frente al “*tiempo de refrigeración*” durante 0, 48 y 96 horas. En el Experimento 2 se usó un ANOVA de una vía junto con la prueba Post-Hoc de Bonferroni para el

# UCUENCA

análisis de las muestras congeladas-descongeladas y vitrificadas-calentadas. Los valores fueron expresados en promedio y error estándar de la media. El nivel de significancia fue considerado cuando el valor de  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Experimento 1. Determinación de la concentración óptima de JR



**Figura 4.** Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de espermatozoides bovinos diluidos con TCG y UHT, suplementados con 0 (control, T0); 0,2 (T1); 0,4 (T2); 0,6 (T3); 0,8 (T4); y 1% (T5) de Jalea Real, y refrigerados durante 48 y 96 h. Presencia de diferentes símbolos expresa diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (\* -  $\alpha$  -  $\beta$   $P < 0,01$ ; \* -  $\beta$   $P < 0,001$ ). Letras diferentes expresan diferencias significativas entre tratamientos en muestras

# UCUENCA

almacenadas durante 48 h (<sup>A-B-C</sup>  $P < 0,05$  para muestras frescas; <sup>a-b-c</sup>  $P < 0,05$  para muestras refrigeradas durante 48 h; y <sup>x-y-z</sup>  $P < 0,01$  para muestras refrigeradas durante 96 h).

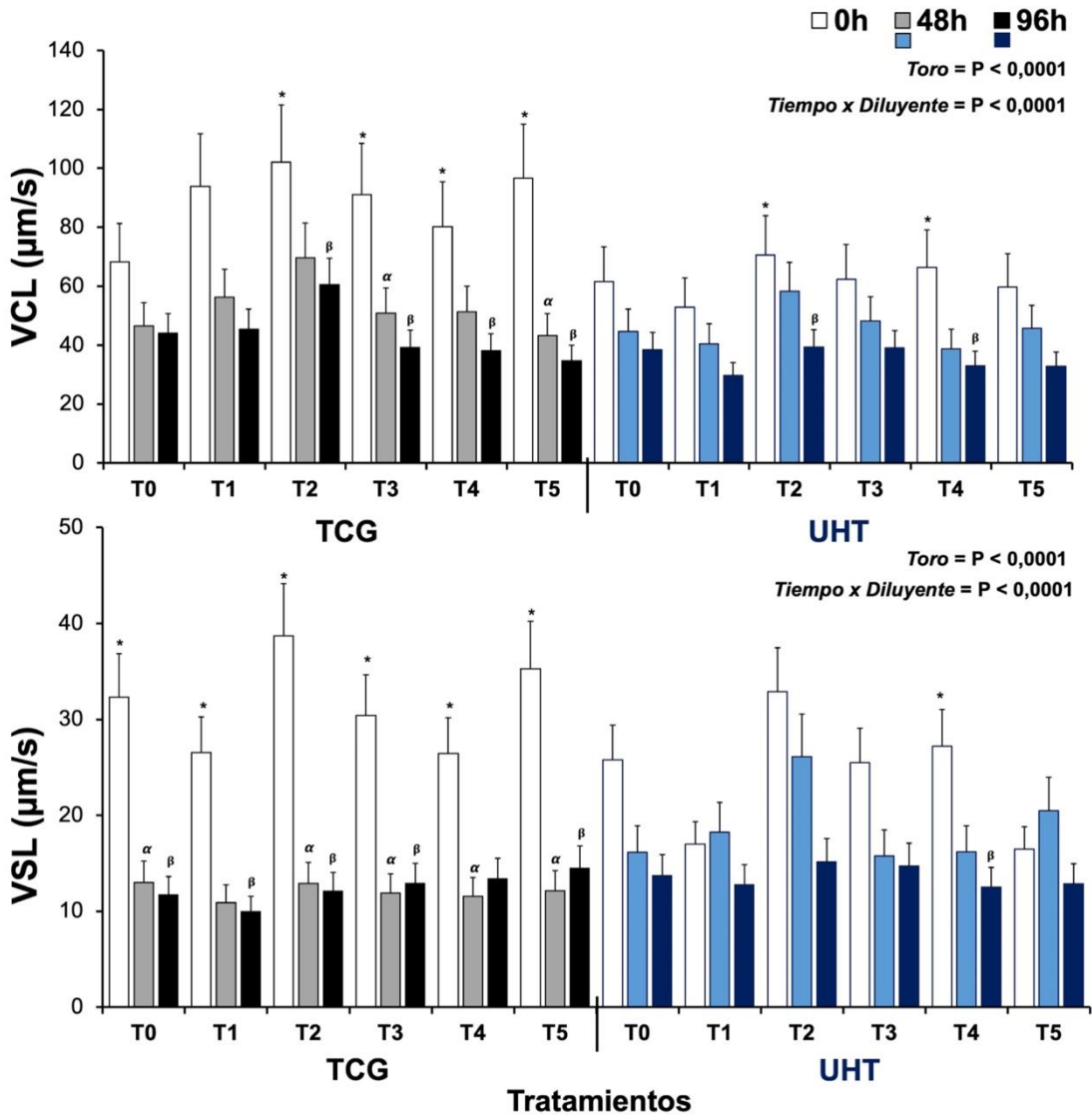
Una interacción significativa ( $P < 0,0001$ ) entre *Tiempo x Diluyente* fue evidenciada en la MT, MP, VCL, VSL y ALH. Además, la MP presentó una interacción ( $P < 0,0001$ ) entre *Tratamiento y Diluyente*. El efecto del reproductor (toro) fue evidenciado en VCL, VSL y ALH ( $P < 0,0001$ ).

En general, la MT, MP, VCL y VSL disminuyeron según incrementó el tiempo de refrigeración hasta las 96 h (Figura 4).

No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) de la MT entre tratamientos de las muestras diluidas tanto con TCG y UHT en ningún momento de almacenamiento (0, 48 o 96 h de refrigeración). No obstante, las muestras frescas de T1-UHT (0,2% de JR) produjo una MP más alta ( $P < 0,05$ ) que todas las muestras frescas y diluidas con UHT (T0, T2, T3, T4 y T5); incluso con un porcentaje superior que su contraparte T1-TCG. En el mismo sentido, a las 48 y 96 horas de refrigeración, el tratamiento T1-TCG produjo una MP que todos los otros tratamientos de UHT y TCG. En este mismo sentido, el tratamiento T2-TCG produjo porcentajes más altos de MP en comparación con todos los otros tratamientos de TCG a las 48 y 96 horas de refrigeración (Fig. 4).

La mejora que se observó en la motilidad de los espermatozoides puede ser causada por los efectos colectivos de la composición química de los aminoácidos y la capacidad antioxidante notable de la RJ, la presencia de iones de calcio en la RJ podría haber mejorado la motilidad de los espermatozoides mediante la capacitación restringida de las células de los espermatozoides (Tetsuya , Kazue , Takafumi , Kaori , & Naoki , 2007) .



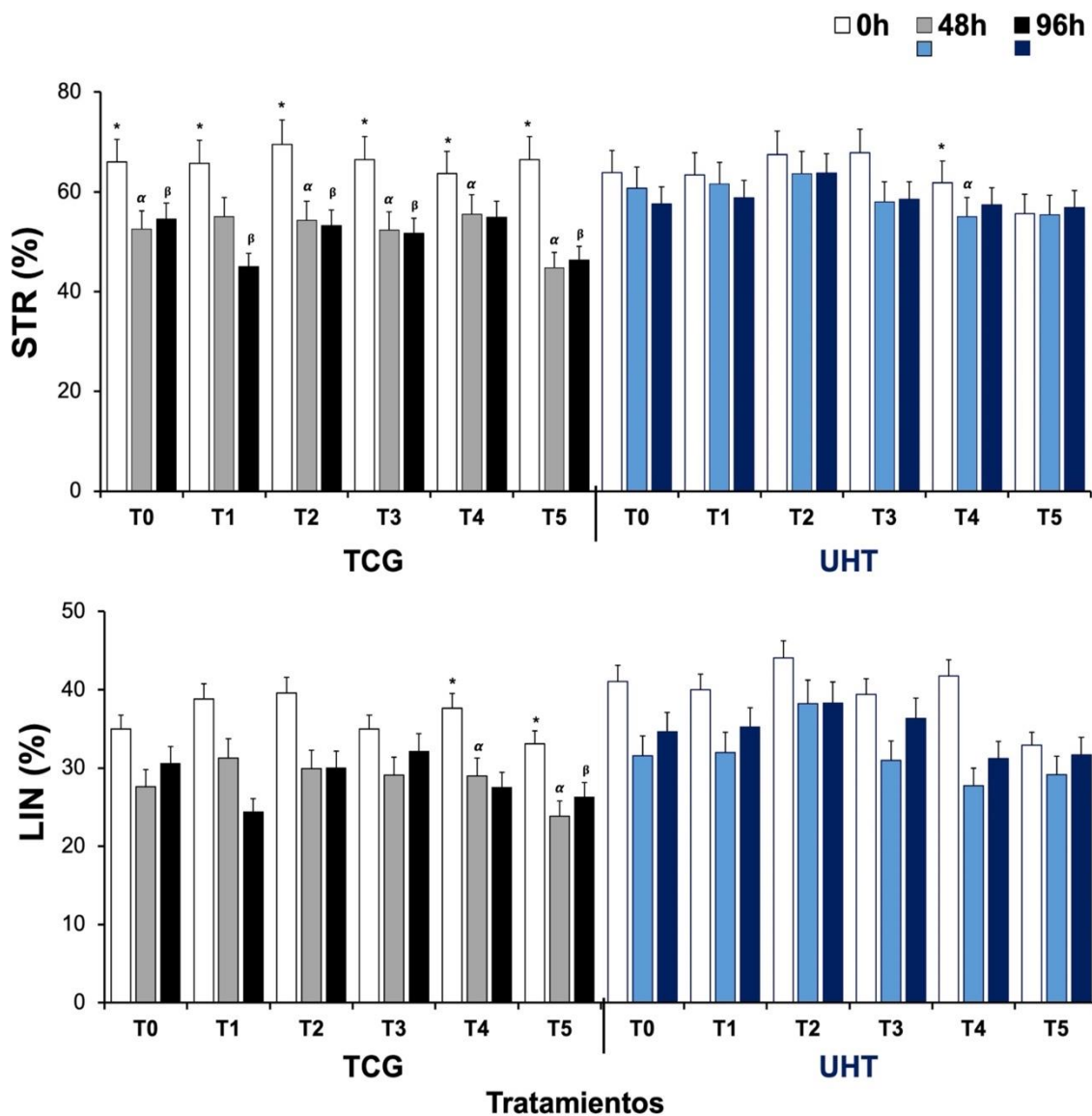


**Figura 5.** Velocidad curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL) de espermatozoides bovinos diluidos con TCG y UHT, suplementados con 0 (control, T0); 0,2 (T1); 0,4 (T2); 0,6 (T3); 0,8 (T4); y 1% (T5) de Jalea Real, y refrigerados durante 48 y 96 h. Presencia de diferentes símbolos expresa diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (\* -  $\alpha$  -  $\beta$  P<0,01; \* -  $\beta$  P<0,001).

En el análisis de las velocidades VCL y VSL no se evidenció diferencias significativas (P<0,05) entre el tratamiento de UHT y TCG a las 0, 48 o 96 h de refrigeración (Fig. 5.). Es importante destacar que el T1-TCG no mostró una

# UCUENCA

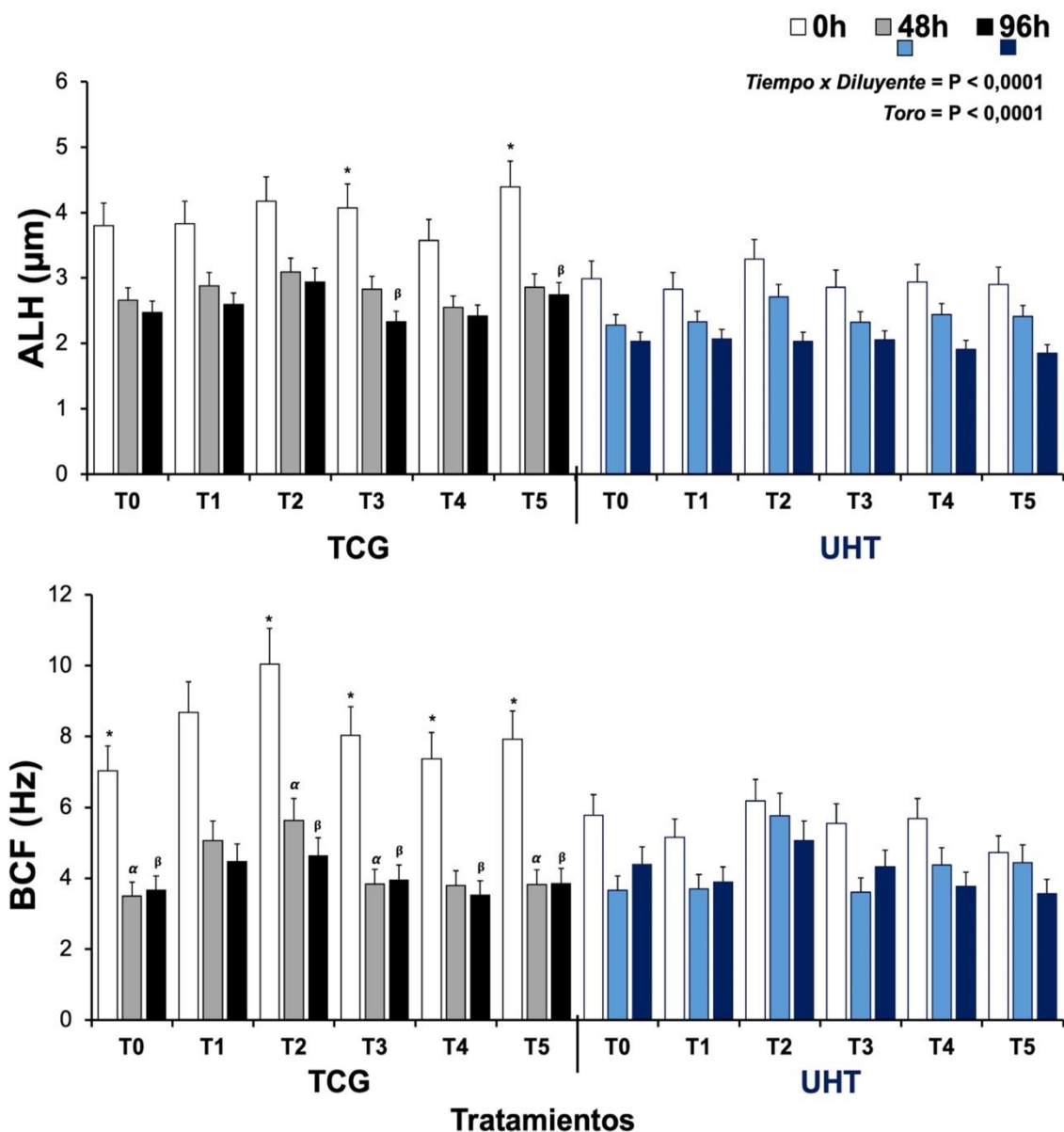
reducción significativa ( $P > 0,05$ ) de la VCL durante las 96 h de almacenamiento; el resto de los tratamientos TCG, la VCL se redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) a las 48 y 96 horas de refrigeración. La misma tendencia se evidenció en T1-UHT, T3-UHT y T5-UHT al no disminuir la VCL durante el tiempo de almacenamiento. Por otro lado, sólo a excepción de T4-UHT, la VSL no fue reducida durante las 48 y 96 horas de refrigeración en todos los tratamientos de UHT (T1, T2, T3, y T5). A diferencia del diluyente UHT, los tratamientos con TCG (T0 – T5) mostraron una reducción drástica ( $P < 0,01$ ) de la VSL durante las 48 y 96 horas de almacenamiento en frío (Fig. 5).



**Figura 6.** Índice de rectitud (STR) y linealidad (LIN) de espermatozoides bovinos diluidos con TCG y UHT, suplementados con 0 (control, T0); 0,2 (T1); 0,4 (T2); 0,6 (T3); 0,8 (T4); y 1% (T5) de Jalea Real, y refrigerados durante 48 y 96 h. Presencia de diferentes símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (\* -  $\alpha$  -  $\beta$   $P < 0,01$ ; \* -  $\beta$   $P < 0,001$ ).

# UCUENCA

Al igual que las velocidades, en los parámetros SRT y LIN no se evidenciaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamiento de UHT y TCG en ningún tiempo de almacenamiento: 0, 48 o 96 h (Fig. 6.). A excepción de T4-UHT, los tratamientos de UHT (T1, T2, T3 y T5) no redujeron ( $P > 0,05$ ) el porcentaje de STR durante las 48 y 96 horas de refrigeración; sin embargo, todos los tratamientos de TCG (T0 – T5) mostraron una disminución significativa de STR durante las 96 horas de refrigeración. Por otro lado, a excepción de los tratamientos T4-TCG y T5-TCG, el porcentaje de LIN no disminuyó ( $P > 0,05$ ) en todos los demás tratamientos tanto de TCG como de UHT (Fig. 6)



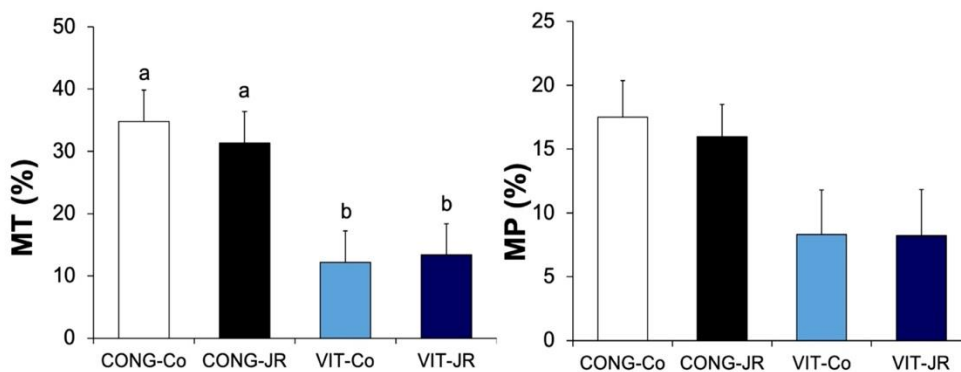
**Figura 7.** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) de espermatozoides bovinos diluidos con TCG y UHT, suplementados con 0 (control, T0); 0,2 (T1); 0,4 (T2); 0,6 (T3); 0,8 (T4); y 1% (T5) de Jalea Real, y refrigerados durante 48 y 96 h. Presencia de diferentes símbolos expresan diferencias significativas en cada tratamiento y diluyente en función del tiempo de almacenamiento (\* -  $\alpha$  -  $\beta$  P<0,01; \* -  $\beta$  P<0,001).

En el análisis de la ALH y BCF no se evidenciaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamiento de UHT y TCG en ningún tiempo de almacenamiento: 0, 48 o 96 h (Fig. 7). A excepción de T3-TCG y T5-TCG, los demás tratamientos de ambos diluyentes no redujeron ( $P > 0,05$ ) sus valores de ALH durante las 48 y 96 horas de refrigeración. Eficientemente, sólo el tratamiento T1 del diluyente TCG (T1-TCG) y todos los tratamientos de UHT (T1-T5) no redujeron ( $P > 0,05$ ) los valores de BCF durante las 48 y 96 horas de refrigeración (Fig. 7).

## 5.2. Experimento 2. Efecto de la JR en semen bovino congelado y vitrificado

De acuerdo con lo detallado en el diseño experimental, la dosis de JR que más beneficios produjo basado en la cinemática espermática fue al 0,2% (T1).

### 5.2.1. Cinemática espermática

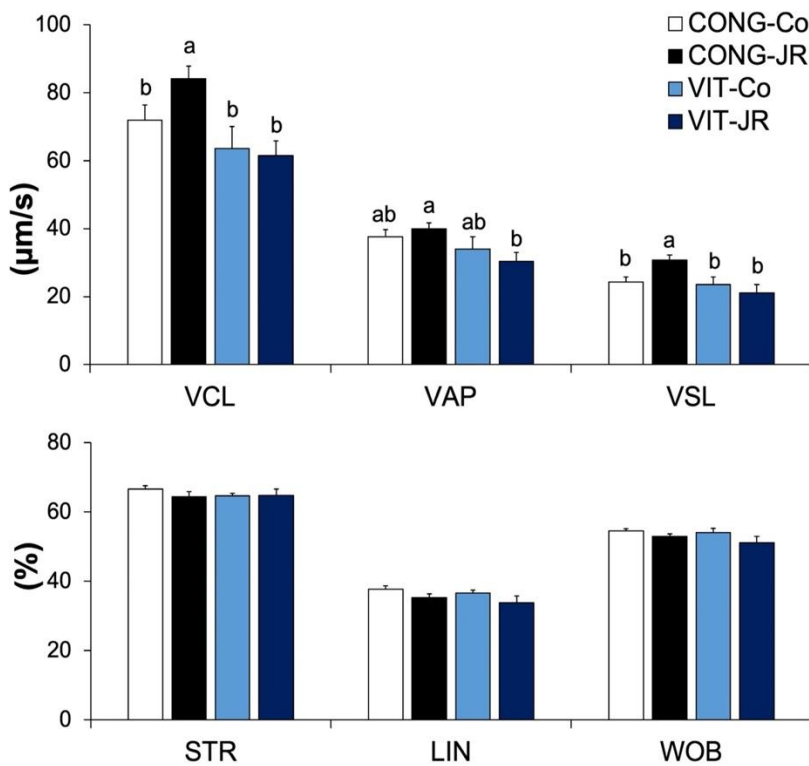


**Figura 8.** Motilidad total (MT) y progresiva (MP) de espermatozoides bovinos congelados – descongelados y vitrificados – calentados y suplementados con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a -b  $P < 0,001$ ).

En general, no se evidenció efecto benéfico de la JR ni en la congelación ni en la vitrificación. La MT fue mayor ( $P < 0,001$ ) en los tratamientos de congelación (CONG-Co y CONG-JR) que en los de vitrificación (VIT-Co y VIT-JR). En la MP, aunque los porcentajes fueron superiores, no se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos de congelación y vitrificación (Fig. 8). La presencia de

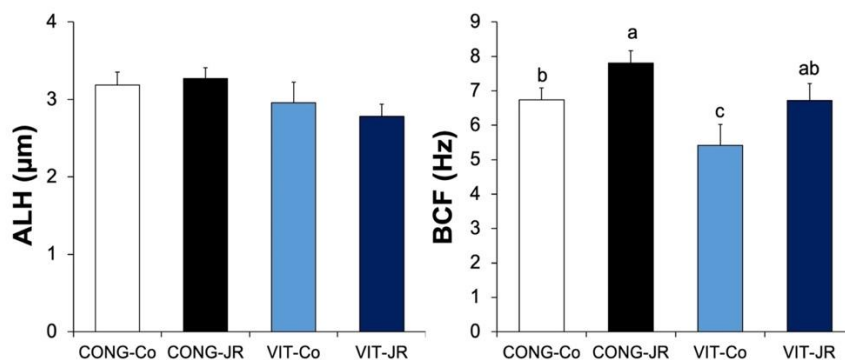
# UCUENCA

grandes cantidades de PUFA en la membrana plasmática de los espermatozoides aumentan la sensibilidad de éstos a la crioconservación y por otro lado, el estrés oxidativo que se genera durante el almacenamiento conduce a una disminución de la calidad de los espermatozoides debido a la baja capacidad antioxidante que poseen los espermatozoides (Partyka, Lukaszewicz, & Nizański, 2012)



**Figura 9.** Velocidad curvilínea (VCL), promedio (VAP), rectilínea (VSL) y parámetros de relación de progresión: rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB), de espermatozoides bovinos congelados – descongelados y vitrificados – calentados y suplementados con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a - b  $P < 0,01$ ).

En el análisis de las velocidades, la adición del JR al medio de congelación (CONG-JR) mostró un efecto positivo al incrementar ( $P < 0,01$ ) los valores de VCL y VSL en comparación con su contraparte control (CONG-Co) y con las muestras vitrificadas ya sea con o sin JR (VIT-Co y VIT-JR). De hecho, las muestras congeladas con JR (CONG-JR) produjo una VAP más alta ( $P < 0,01$ ) que aquellas vitrificadas con JR (VIT-JR). En los parámetros de relación de progresión (STR, LIN y WOB) no se evidenciaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos de congelación y vitrificación (Fig. 9). El impacto positivo de la RJ probablemente se debe a que esta reduce la exposición de los espermatozoides al estrés oxidativo ya que en su composición se encuentra un alto contenido de ácido pantoténico que tiene un efecto antioxidante (Hove , Dimick, & Benton , 1985).



**Figura 10.** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida del flagelo (BCF) de espermatozoides bovinos congelados – descongelados y vitrificados – calentados y suplementados con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a - b - c  $P < 0,05$ ; a - c,  $P < 0,001$ ).

No existieron diferencias significativas de la ALH entre tratamientos de congelación y vitrificación. Sin embargo, la adición de JR a los medios de congelación (CONG-JR) y vitrificación (VIT-JR) mejoró los valores de BCF en



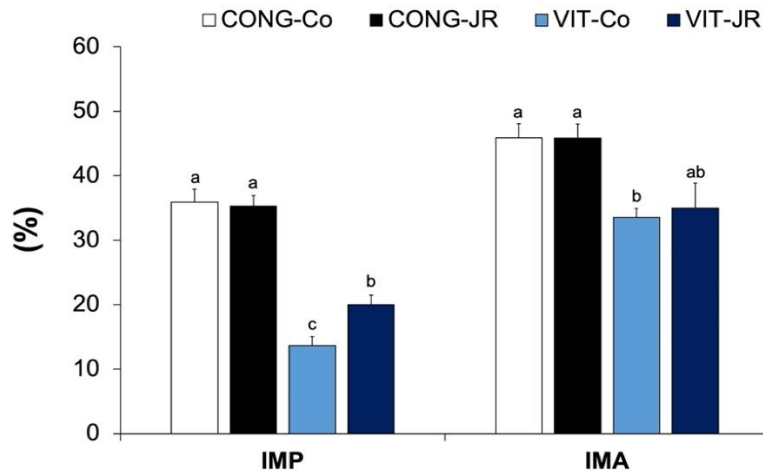
comparación con sus contrapartes controles (CONG-Co y VIT-Co, respectivamente) (Fig. 10).

## 5.2.2. Integridad de membranas

Al análisis simultáneo de la integridad de la membrana plasmática y acrosomal evaluada mediante la prueba de doble tinción fluorescente (PI/PNA-FITC) mostró porcentajes más altos ( $P < 0,01$ ) de IPIA en las muestras congeladas que en las vitrificadas. Sin embargo, solo en las muestras vitrificadas hubo un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) de la JR al evidenciar un incremento (VIT-JR) de IPIA en comparación con su contraparte control (VIT-Co). En este mismo sentido, las muestras vitrificadas con (VIT-JR) y sin JR (VIT-Co) produjeron un menor porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática íntegra, pero con acrosoma dañado (IPDA) en comparación con las muestras congeladas control (CONG-Co). Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado (indeseable) fue menor ( $P < 0,05$ ) en aquellas muestras congeladas (CONG-Co y CONG-JR) que las vitrificadas (VIT-Co y VIT-JR), independientemente de la adición de JR (Fig. 11).

La RJ podría mantener la integridad acrosomal en la congelación debido a que su composición contiene hormonas que disminuyen los radicales de oxígeno y, por lo tanto, reducen la cantidad necesaria de moléculas para ser eliminados por la enzima superóxido dismutasa que se encuentran presentes normalmente en el plasma seminal para contrarrestar los efectos del ROS en la peroxidación de lípidos y prevenir el daño de los espermatozoides (Ganczarezyk, Kuklinska, Sadowska, Strzezek, & Belinska, 2006).





**Figura 12.** Integridad de la membrana plasmática – viabilidad (IMA) y de la membrana acrosómica (IMA) de espermatozoides bovinos congelados – descongelados y vitrificados – calentados y suplementados con 0,2% de JR. CONG-Co, congelado control; CONG-JR, congelado con JR; VIT-Co, vitrificado control; y VIT-JR, vitrificado con JR. Letras diferentes en cada barra expresan diferencias significativas entre tratamientos en cada motilidad (a - b - c  $P < 0,05$ ; a - c,  $P < 0,01$ ).

## 6. DISCUSIÓN

Esta investigación determinó en un primer experimento que la suplementación con jalea real al 2% a diluyentes de base sintética y no sintética produce mejores respuestas cinemáticas basadas en progresividad y velocidades de espermatozoides bovinos refrigerados a largo plazo, incluso sin la variación de sus valores durante 96 horas de almacenamiento. Un segundo experimento demostró que la congelación produjo una mayor criosupervivencia espermática basada en cinemática e integridad de membranas comparada con la vitrificación. En la congelación, la adición de JR mejoró las velocidades (VCL y VSL) y la BCF, mientras que en la vitrificación sólo se denotó un mejoramiento de BCF. Por otro lado, a diferencia de la congelación, la JR mejoró la integridad simultánea de las membranas plasmática y acrosómica (IPIA e IMP equivalente a la viabilidad), lo que demuestra que la JR produce un efecto crioprotector durante el proceso de vitrificación – calentamiento.

Abd-Allah (2010) demostró que la JR (0,4%) adicionada al diluyente a base de Tris fue capaz de mejorar los parámetros de función espermática. Además, la RJ protegió la espermática y acrosomal a las 2 horas de incubación a comparación con su control. El presente estudio es consistente con el mencionado anteriormente, sin embargo, la dosis que produjo mejores resultados fue al 0,2% de JR durante las 48 y 96h de refrigeración.

La criopreservación induce daños en el espermatozoide lo que reduce su vida fértil. El presente estudio demostró que adición de JR 0,2% al diluyente TCG y UHT mantuvo la MT sin mostrar una diferencia significativa durante las 96h de refrigeración. Estos resultados concuerdan con Abd-Allah, (2012) quien en su demostró que la 0,04% de JR adicionada al Tris + heparina, tuvo un efecto significativo en cuanto a motilidad espermática de búfalo en comparación con el grupo control durante 3 h de incubación. Y de igual forma la integridad acrosómica fue significativamente mayor en el grupo JR que en el grupo control (71,3 vs 55,6%).

# UCUENCA

Los efectos de la suplementación de JR al diluyente yema de huevo Tris en carneros con diferentes niveles (1, 3, 5%) durante la refrigeración de semen por 7 días no revelaron diferencias significativas entre los grupos en la MP, velocidades, integridad de membrana y viabilidad según (Amini et al.,2019). Estos resultados son consistentes a los resultados de la presente investigación al no evidenciar diferencias significativas en VCL y VSL entre los tratamientos TCG y UHT a las 0, 48 y 96 horas de refrigeración, pero el T1-TCG y T1-UHT.

(Sherbiny, 2013) en su estudio en conejos, demostró que más del 88% de los espermatozoides se encontraron móviles para el semen diluido con 10mg de RJ /6ml de diluyente) vs 83% para el diluyente de miel al 2% y 53% para el diluyente basal de Tris-citríco-glucosa-DMSO+20% YH, los valores de motilidad progresiva después de la descongelación para los diferentes diluyentes variaron de forma descendente para las concentraciones ascendentes de RJ, lo que concuerda con los resultados de la presente investigación en donde a pesar de que hubo una MP superior no fue significativa por ende no se evidenciaron diferencias significativas ( $p>0,05$ ) en congelación ni en vitrificación.

(Moradi et al., 2013) en su estudio con semen de carneros determinaron que la JR tiene un efecto protector significativo en bajas concentraciones (0,5 y 1%) evitando daños a la membrana plasmática, durante el almacenamiento en refrigeración. Además, la VSL después de 72h no presento diferencias significativas ( $p>0,05$ ) entre el control y los tratamientos que fueron suplementados con 1 y 1,5% de RJ.

(Amini et al., 2019) demostraron que la JR al 0,5% protegió de los daños a la membrana plasmática durante el almacenamiento, mejorando notablemente las velocidades (especialmente la VSL). Estos resultados coinciden con los del presente estudio donde se observó que la JR en menor concentración (0,2%) incremento la VSL y VCL con respecto al grupo control tanto en congelación como en vitrificación.

# UCUENCA

En un estudio realizado en gallos alimentados con diferentes dosis de RJ, se obtuvo resultados similares a los de la presente investigación, en donde la integridad de la membrana plasmática en el grupo JR (100 mg) fue mayor que en los demás tratamientos post-descongelación. De igual forma la MP en el grupo RJ100 fue más alto que en los demás grupos después de las 48h a 4°C (Golsoumeh et al., 2020). En el presente estudio, se evidenció que la adición de RJ al 0,2% tuvo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) al incrementar la IPIA (VIT-JR) en comparación con el control.

## CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio sugiere que la jalea real suplementada a dosis bajas (0,2%) en los diluyentes de base sintética TCG y no sintética UHT tiene un efecto positivo sobre la motilidad progresiva y las velocidades (curvilínea [VCL] y rectilínea [VSL]) del esperma refrigerado a largo plazo.

En cuanto a los resultados de congelación (CONG-JR vs. CONG-Co,  $P < 0,05$ ), la JR aumentó VCL, VSL y frecuencia de latido (BCF); mientras que durante la vitrificación (VIT-JR vs. VIT-Co,  $P < 0,05$ ), la JR mejoró el BCF y la integridad de las membranas plasmáticas y acrosómicas.

En lo referente a la integridad de las membranas plasmática y acrosomal se concluye que la adición de jalea real al 0,2% protege mejor las membranas espermáticas durante la vitrificación que en el proceso de congelación.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Abd-Allah, S. M. (2012). Efecto de la jalea real sobre la capacidad de fertilización de los espermatozoides de búfalo in vitro . *Journal of Buffalo Science*, 1(1).
- Directorio cartográfico de Google Maps. (2020).
- Grosso, S., Hernández , A., Osorio , M., & Gómez, M. (2012). Propiedades fisicoquímicas y estándares de la calidad de la jalea real de dos linajes de abejas *Apis Mellifera* ( Hymenoptera: Apidae) para Colombia. . *Congreso Latinoamericano de Química, Cancún (México)*. Cancún.
- Abd-Allah, S. M. (2010). Efecto de la jalea real sobre las características de espermatozoides bovino durante la incubación in vitro posterior a la descongelación. *Rev. vet.*, 21(2), 81-85.
- Aguero , G. (2012). *Evaluación de las características seminales de sementales bovinos mediante el Analizador Seminal Computarizado (CASA)*. Doctoral, Universidad Central de Venezuela .
- Aitken, R. J. (2014). Aspectos de la fisiología del espermatozoides y el estrés oxidativo y la funcionalidad de los espermatozoides de semental. *Elsevier* , 27.
- Alcay, S., Berk, M., Tekin, N., & Gokce, E. (2016). Los diluyentes a base de lecitina de soja suplementados con jalea real mejoran la calidad posterior a la descongelación y la resistencia a la incubación de los espermatozoides de cabra . *Criobiology*.
- Alvarez , J. G., Touchstone, J. C., Blasco , L., & Storey, B. T. (1987). Peroxidación lipídica espontánea y producción de peróxido de hidrógeno y superóxido en superóxido dismutasa de espermatozoides humanos como principal enzima protectora contra la toxicidad del oxígeno. *Andrología*, 8(5), 338-348.
- Amidi, F., Pazhohan, A., & Shabani, M. (2016). El papel de los antioxidantes en la congelación de espermatozoides: una revisión. . *Banco de tejidos celulares*, 745-756.
- Amini , S., Masoumi , R., Rostami , B., Shahir , M., Taghilou, P., & Arslan , H. (2019). Efectos de la suplementación de Tris-diluyente de yema de huevo con jalea real sobre las características del semen de carnero refrigerado y congelado-descongelado. *Cryobiology*, 88, 75-80.



# UCUENCA

- Aragón , L. (1958). *Apicultura Moderna* (Tercera ed.). México D.F.: Bartolomé Trucco.
- Arata , G., Osuna , J., Gómez , R., & Regadera , J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab.*, 3(3).
- Arav. (2014). Criopreservación de ovocitos y embriones. *Theriogenology*, 81(1), 96-102.
- Arav, E. G., Yavin , S., Zeron , Y., Natan , D., Dekel , I., & Gacitua , H. (2002). Nuevos métodos de criopreservación en gametos. *Endocrinología celular y molecular*, 187(2), 77-81.
- Arestegui, F., Machado , C., & Urioste , V. (2017). *Comparación entre la efectividad de la crio preservación y la vitrificación seminal de chivos durante la estación no reproductiva*. Universidad de la República , Montevideo.
- Ávila , L., Bacter, M., Madero , J., Bacter , C., León , M., Acosta , L., . . . Reguero , M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol*, 57(4).
- Bravo, S. V. (2015). Evaluacion de dos diluyentes para la crioconservacion de semen de bovino: yema de huevo y leche descremada . *Universidad Politécnica Balanceado*, 83.
- Broto, P. (1989). Composicion y propiedades de la jalea real. *La vida Apícola*(3).
- Cal, I. (1991). *Evaluación de la sincronización del celo e inseminación artificial en ganado de carne*. Pregrado, Zamorano .
- Canteras, N. (2019). *Comparación entre la congelación clásica y la vitrificación cinética de semen de chivos durante la estación reproductiva*. Pregrado, Universidad de la República , Montevideo.
- Castelo. (2008). Consideraciones sobre la criopreservacion de semen de caprinos. *Acta Vet. Bras.*, 2, 67-75.
- Contreras , C., Contreras , F., Macias , J., Tapia, J., Petukhova , T., & Guzmán , E. (2017). Efecto de diferentes sustratos sobre la aceptación de larvas injertadas en la crianza de reinas de abejas melíferas (*Apis mellifera*) comerciales,. *Apicultural Science*, 61(2), 240-250.
- Cordova, A. (2010). Estrés oxidativo en gametas. *Redvet*, 33.

- Escobar. (2013). *Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción.*
- Fernández , A., Gonzalvo , M., Clavero, A., Ruiz , R., Zamora , S., Roldán , M., . . . Castilla José. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Biología de la reproducción* .
- Fernández. (2005). Comportamiento de diferentes diluyentes en base a leche con adición de yema de huevo BAY glicerol para la preservación de semen de carnero refrigerado. *Universidad de la República*, 52.
- Gadea , J. (2003). Revisión: diluyentes de semen utilizados en la inseminación artificial porcina. *Revista de Investigación Agrícola*, 1(2), 27.
- Galarza, D., López, S., & Santiago, J. (2020). Complementar un diluyente a base de yema de huevo de leche desnatada con L-carnitina ayuda a mantener la motilidad, la integridad de la membrana y la capacidad de fertilización de los espermatozoides de carneros. *Reproduction in Domestic Animals*.
- Ganczarezyk, D., Kuklinska , M., Sadowska , J., Strzezek, J., & Belinska, B. (2006). Aromatización y capacidad antioxidante en testículos de topillos de banco de cría estacional: efectos de. *Theriogenology*, 65, 1376-1395.
- Gao, D., & Critser, J. K. (2000). Mecanismos de criolesión en células vivas. *ILAR*, 41(4), 187-196.
- García , L. (2016). Comparación de la motilidad postdescongelación de semende bovino criopreservado en triladyl y optidyl fresco y congelado.
- Garcia, W. (2014). *Optimización de los protocolos de criopreservación de semen ovino de las razas autóctonas en peigro de extinción Xisqueta y Aranesa*. Doctoral, Universida Autonoma de Barcelona .
- Garner , D., Pinkel, D., Johnson , L., & Pace , M. (1986). Evaluación de la función de los espermatozoides mediante análisis de citometría de flujo y tinción fluorescente dual. . *Biol. Reprod.*, 34, 127-138.
- Garner, D., Gledhill, B., Pinkel, D., Lake, S., Stephenson , D., Vandilla, M., & Johnson, L. (1983). Cuantificación de espermatozoides portadores de cromosomas X e Y de animales domésticos mediante citometría de flujo. . *Biol. Reprod.*, 28, 310-325.

- Garner, D., Johnson, L., & Allen, C. (1988). Evaluación fluorométrica de espermatozoides bovinos criopreservados extendidos en yema de huevo y leche. *Theriogenology*, 34, 369-375.
- Gil, A., Cardona, W., Agarwal, A., Sharma, R., & Cadavid, A. (2010). Evaluación de factores espermáticos posiblemente involucrados en la pérdida recurrente temprana de la preñez. *Fertility and Sterility*, 94(2), 1465-1472.
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. (2005). Evaluación citométrica de flujo de parámetros espermáticos en relación con el potencial de fertilidad. *Theriogenology*, 63(2), 445-457.
- Golsoumeh, R., Hamid, D., Zarbakht, A.-P., Mohammad, K., & Saheb, M. (2020). La administración oral de jalea real puede mejorar la conservación de los espermatozoides de gallo. *Anim Physiol a Anim Nutr*.
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kielland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Avances recientes en las técnicas de criopreservación de espermatozoides bovinos con un enfoque en la optimización de la calidad del espermatozoide post-descongelación. *Reproduccion en animales domesticos*, 54(4), 655-665.
- Gueguero, G. (2014). Manual de procedimientos para la colecta y criopreservación de semen bovino. *Universidad Cooperativa de Colombia*, 90.
- Guevara, R., Narváez, J., Guevara, G., Torres, C., Arcos, C., & Lascano, P. (2017). La altura del pastizal y su relación con la producción lechera de vacas en pastoreo. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 1(1).
- Gutiérrez, O., Juárez, M., Uribe, S., & Trujillo, M. (2009). La criopreservación de espermatozoides de verraco en medios de congelación enriquecidos con bajo contenido de glicerol / trehalosa mejora la integridad celular. *Cryobiology*(58), 287-292.
- Hernández, A. (2015). Actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión del plasma seminal de cerdo. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 14.
- Holt. (2000). Aspectos fundamentales de la criobiología espermática: la importancia de las especies y las diferencias individuales. *Theriogenology*, 47-58.
- Holt, W. V., & Penfold, L. M. (2014). Andrología animal: teorías y aplicaciones. (Chenoweth, Ed.) *Anim. Andol. Theor. Appl*, 78-81.

# UCUENCA

- Hove , S., Dimick, P., & Benton , A. (1985). Composición de jalea real recién recolectada y comercial. *Apics. Res.*, 24, 50-60.
- Huanca, W. (2001). Inseminación artificial a tiempo fijo en vacas lecheras. *Rev. Investig. Vet.*, 12(2).
- Lema , A. (2011). *Efecto de la criopreservación en la calidad y fertilidad del esperma.* (M. Milad , Ed.) Debre Zeit, Etiopía.
- Li, J., Wang , T., & Peng, W. (2007). Análisis comparativo de los efectos de diferentes condiciones de almacenamiento sobre las principales proteínas de jalea real. *Apicultural Research*, 46(2).
- Llanos , M., & López , T. (2019). Ensayo comparativo entre congelación lenta y vitrificación espermática. *Biología celular* .
- Lozano , H. (2009). Factores que afectan la calidad seminal en toros: Criopreservacion. *Rev. Med. Vet. Zoot.*, 56, 270.
- Maghsoudlou, A., Sadeghi , A., Hossein , M., & Toldra, F. (06 de febrero de 2019). Jalea Real: Química, almacenamiento y actividades. *Apicultural Science*, 63(1), 17-19. doi:10.2478/JAS-2019-0007
- Maxwell, W., & Watson , P. (1996). Recent progress in the perservation of ram semen. *Animal Repro*, 42, 55-65.
- Medina, V., Sánchez, E., Velasco, Y., & Cruz, P. (2007). Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA). *Revista ORINOQUIA*, 11(7), 75-77. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/896/89611108.pdf>
- Membrillo , A., Córdova , A., Hicks , J., Olivares , I., Martínez , V., & Valencia , J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *INCI*, 28(12).
- Moradi, A. R., Malekinejad, H., Farrokhi, F., & Bernousi , I. (2013). La Jalea Real mejora los parámetros espermáticos del semen de carnero durante el almacenamiento líquido y sirve como fuente de antioxidantes. *Investigacion de pequeños rumiantes*, 113, 346-352.
- Muiño , R. (2006). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citomertría de flujo: Identificacion de*

# UCUENCA

*subpoblaciones espermáticas*. . Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, Galicia.

Muiño , R. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen de torobovino mediante el uso de sistemas CASA y Citometría de Flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas*. . Doctorado, Universidad Santiago de Compostela, Santiago de Chile.

Murtary, M. G. (2021). Uso de antioxidantes para aumentar la eficiencia del semen durante el almacenamiento de líquidos y la criopreservación en animales de ganado: una revisión. *Ciencias de la Universidad de Saul*, 33(1).

Nozaki, R., Tamura , A., Ito, T., Moriyama K, Yamaguchi, T., & Kono . (2012). Un método rápido para aislar proteínas solubles de jalea real. *Química de Alimentos*, 134(4), 2332-2337.

Olimpia, P., Marghitas , & Dezmirean , D. (2008). Un estudio sobre la composición fisicoquímica de la jalea real fresca y liofilizada. *Artículos científicos, Zootecnia y Biotecnologías*, 41, 328-335.

Partyka, A., Lukaszewicz, E., & Niżański, W. (2012). Efecto de la criopreservación sobre los parámetros espermáticos, la peroxidación lipídica y la actividad de enzimas antioxidantes en semen de aves. *Theriogenology*, 77(8), 497-504.

Pérez , C., & Jimeno, C. (1990). La jalea real. *Ministerio de agricultura, pesca y alimentacion* , 88(19).

Pickard, R., & Kither , G. (1983). Aceptación de larvas obreras trasplantadas por colonias iniciadoras de celdas reinas. *Apicultural Research*, 22(3), 169-180.

Quintero, A., Mayorga, J., & Cardona, W. (2017). El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *Journal of Veterinary Andrology*, 2(1), 30-37.

Reina , T. (2010). *Producción y análisis financiero de la obtención de Jalea Real de abejas (Apis Mellifera) por el método doolittle*. Pregrado, Escuela politecnica nacional , Quito.

Restrepo , G., Duque, J., & Montoya , J. (2012). Efecto de dos protocolos de criopreservación sobre la capacidad fecundante del semen de semental (Equus caballus). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(2).

Restrepo. (2013). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Lasallista*, 9.

- Ribeiro, A. (2013). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Med-Vet*, Universidad Estadual Paulista.
- Ribeiro, A., Munita, L., Yumi, M., Mello, M., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch Med Vet*, 46, 30-32.
- Rubio, J., Quintero, A., & González, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias*, 19(14).
- Sabatini, A., Marcazzan, M., Caboni, S., Bogdanov, & Almeida, L. (2009). Normalización de la calidad de la jalea real. *Apiproducción y Ciencia Médica*, 1, 1-6.
- Salamanca, G., Osorio, M., & Reyes, L. (2013). Parámetros físico-químicos de calidad de la jalea real elaborada por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), en Colombia. *Zootecnia Trop.*, 31(4), 311-324.
- Sanchez, C. (2003). *Crianza y producción de abejas*. Lima - Peru: Servilibros.
- Sarh. (1990). Orientaciones técnicas. En *La cría de abejas reinas*. Distrito Federal, México.
- Sherbiny. (2013). Efecto de Jalea Real en diluyentes a base de yema de huevo con miel sobre la motilidad, viabilidad y capacidad fertilizante de espermatozoides de conejo congelados. *Egyptian Journal of Rabbit Science*, 23(2), 149-152.
- Sherbiny. (2013). Efecto de la Jalea Real en diluyentes a base de yema de huevo con miel sobre motilidad, viabilidad y capacidad fertilizantes de espermatozoides de conejo congelados. *Egyptian Journal of Rabbit Science*, 12.
- Tetsuya, K., Kazuo, U., Takafumi, N., Kaori, I., & Naoki, N. (2007). Composiciones de Jalea Real II. Glucósidos ácidos orgánicos y esteroides de la jalea real de abejas (*Apis mellifera*). *Chem. Pharm.*, 55, 1528-1531.
- Ugarelli, A., Evangelista, S., & Santiani, A. (2017). Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Rev. investig. vet. Perú*, 28(1).
- Viada, E., Gómez, L., & Campaña, R. (2017). Estrés Oxidativo. *ccm*, 21(1).
- Jacqueline Estefanía Guanga Tenempaguay  
Juan Ismael Lucero Zhumi

# UCUENCA

- Viñan , H. (2017). *Adición de Metil B-Ciclodextrina cargada de colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holsteins Friesian*. Potgrado, Universidad Nacional Agraria La Molina .
- Vishwanath, R., & Shannon , P. (2000). Almacenamiento de semen bovino en estado líquido y congelado. *Ciencias de la Reproducción Animal*, 62, 23-53.
- Watson , P. F. (2000). Las causas de la fertilidad reducida con semen criopreservado. *Ciencia de la Reproduccion Animal* 481-492, 60.
- Whatson, P. F. (1995). Desarrollos y conceptos recientes en la criopreservación de espermatozoides y la evaluación de su función posterior a la descongelación. *Reproduccion, fertilidad y desarrollo*, 7(4), 871-891.
- Ximénez , J. (2017). *Pruebas de evaluación y capacitación espermática utilizadas en el análisis seminal del toro*. Revisión Bibliográfica, Universidad Cooperativa de Colombia.
- Zúñiga , A. (2019). *Producción de jalea real para el sector apícola costarricense*. Costa Rica.



## 7. ANEXOS



Anexo 1. Equipo de trabajo (Juan, Dr. Luis G., Jacqueline)



Anexo 2. Colmenas para producir jalea real (RJ)



Anexo 3-4. Alimentación de abejas





Anexo 5. Suplemento alimenticio para abejas



Anexo 6. Traslarve



Anexo 7-8. Copaceldas para producir RJ y Colecta de RJ



Anexo 9-10-11. Traslado y extracción de RJ para su almacenamiento



Anexo 12-13. Ingredientes para elaboración de diluyentes



Anexo 14-15. Diluyentes preparados y centrifugación de diluyentes



Anexo 16-17. Dosificación de diluyentes con RJ y sin RJ, Congelamiento de diluyentes



Anexo 18. Extraccion de semen toro Miguel (Nero)



Anexo 19. Extraccion de semen toro Valentin (Irquis)



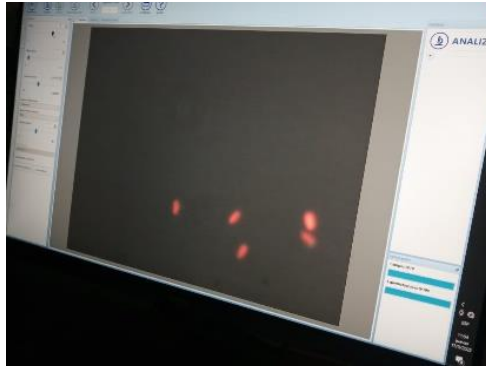
Anexo 20. Toro Coronel para extraccion de semen (Irquis)



Anexo 21. Pajuelas con semen para congelacion



Anexo 22-23. Vitrificacion de semen y almacenamiento de pellets



Anexo 24. Evaluacion de integridad de membranas (DPIA)



Anexo 25. Evaluacion de integridad de membranas (IPDA)