



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD Y FERTILIDAD
DEL SEMEN DE CONEJO NUEVA ZELANDA BLANCO
REFRIGERADO A 4°C, UTILIZANDO COMO
EXTENDER LECHE DE VACA ULTRAPASTEURIZADA
“LIGTH” CON O SIN JALEA REAL DE *APIS MELLIFERA*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICA
VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

LAURA KETZALI SÁNCHEZ REYES

Asesores:

MVZ G. Hilda Jandete Díaz
MVZ MPA. Juan Alberto Balcázar Sánchez



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres, Julito y Lupita, quienes desde que tengo memoria han estado para apoyarme y orientarme; gracias por estar en cada paso que doy y por brindarme todas las herramientas para seguir adelante, son mi mayor motor; este logro es más suyo que mío.

A mi hermana Valeria, por apoyarme y acompañarme en todo este camino, por ser la mejor compañera de desvelos y prepararme las mejores cenas en las horas de estudio; eres la mejor amiga y hermana que la vida pudo darme y la persona más fuerte y divertida que conozco, te quiero muchísimo

A mis abuelitos Tere y Arturo, por ser mis segundos padres y darme todas sus enseñanzas, cariño y apoyo, gracias por seguir acompañándome en este camino, esta tesis también es para ustedes

A mis tíos Chucho, Sandra y Miriam por todo el cariño que me han brindado a lo largo de mi vida y durante mi formación académica, gracias por acompañarme, quererme y cuidarme.

A mis mejores amigos Ulises, Erick y Sergio por estar y acompañarme en todo momento, los adoro como un tesoro.

A mis amigos de la Facultad Liz, Mafer, Sary, Raquel, Maya, Selene, Javi e Ylse por acompañarme y apoyarme durante toda la carrera, gracias por hacer más divertidas todas las clases, horas de estudio y prácticas, los y las quiero.

A la Sra. Magda Garza por permitirme desde niña a encontrar mi vocación, que donde quiera que se encuentre sepa que esta tesis también es para usted.

Y no menos importantes, a todos los animales de enseñanza que fueron vitales para mi formación como MVZ.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque además de abrirme las puertas al conocimiento, me ha brindado una familia.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme las herramientas para mi formación profesional

A la MVZ Hilda Jandete Díaz por toda su paciencia, tiempo, enseñanzas, experiencias y conocimientos que compartió como supervisora de Servicio Social y como asesora de esta tesis

Asimismo, a mi segundo asesor el MPA MVZ Juan Alberto Balcázar Sánchez por todas sus enseñanzas, herramientas, aportaciones y paciencia para la realización de esta investigación.

A la M en C MVZ Marisa del Carmen Vázquez García por brindarme las herramientas, apoyo y conocimientos durante mi estancia como Servicio Social y durante la elaboración del presente trabajo.

A la MPA MVZ Frida Salmerón Sosa por todas sus portaciones, apoyo y paciencia desde el inicio hasta el final de la esta investigación.

A todo el personal del área Cunícola del Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola por compartir todos sus conocimientos y enseñanzas durante mi estancia en este centro

A los futuros MVZ Karina Oropeza Hernández y Juan de Dios Valdivieso Cruz por su apoyo durante la elaboración de esta investigación.

A todos los miembros del jurado por su tiempo, aportaciones y correcciones para enriquecer desde el inicio la realización de esta tesis

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	20
REFERENCIAS.....	21

RESUMEN

SÁNCHEZ REYES LAURA KETZALI: Comparación de la viabilidad y fertilidad del semen de conejo Nueva Zelanda Blanco, refrigerado a 4°C utilizando como extender leche de vaca ultrapasteurizada “light” con o sin jalea real de *Apis mellifera*. (Bajo la dirección de la MVZ G. Hilda Jandete Díaz y MVZ MPA Juan Alberto Balcázar Sánchez)

La cunicultura en China, Italia, Venezuela y Corea ha experimentado un gran desarrollo, motivado por la aplicación de tecnologías en la reproducción, donde la evaluación del semen, los métodos de conservación de este y la Inseminación Artificial (IA) han permitido una mejora en la producción. La práctica exitosa de esta técnica implica la obtención de semen y su preservación adecuada. Dentro de este proceso, la preservación ha sido particularmente difícil a diferencia de otras especies, ya que en el conejo no se ha encontrado un extensor adecuado para mantener la viabilidad de los espermatozoides colectados.

El objetivo fue evaluar el efecto de la Jalea Real de *Apis Mellifera* a una concentración de 0.5% con leche ultrapasteurizada “light”, para la conservación en refrigeración (4°C) de semen de conejo Nueva Zelanda Blanco. Para la obtención de muestras seminales se utilizaron tres machos reproductores de la raza Nueva Zelanda Blanco, de los cuales se obtuvieron y evaluaron 8 muestras seminales; y fueron empleadas un total de 32 conejas de la raza Nueva Zelanda Blanco, para posteriormente ser inseminadas de la siguiente manera: 8 conejas a las 24 h con leche ultrapasteurizada light, 8 conejas a las 24 h con leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%, 8 conejas a las 36 h con leche ultrapasteurizada light y 8 conejas a las 36 h con leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%. Se realizó el diagnóstico de gestación 13 días después de la inseminación mediante la técnica de palpación abdominal. Antes de realizar la IA con cada una de las muestras, se elaboró la tinción con Eosina y Nigrosina frotis, para comprobar el número de espermatozoides vivos y muertos.

No se observó diferencia estadística significativa $P \geq 0.05$ entre la proporción de hembras gestantes atribuible al extender del semen. En cuanto a la evaluación del semen conservado, se pudo observar que utilizando como extender la leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5% se presentó un promedio mayor de espermatozoides vivos ($77.81 \geq 70.69$) ($p=0.041$); sin embargo, el promedio de espermatozoides muertos no mostró evidencia estadística suficiente ($20.00 \leq 24.94$) ($p=0.09$) utilizando este extender. Por lo que se concluye que ambos medios, con y sin JR, permiten conservar el semen de conejo refrigerado a 4°C y mantener su capacidad de fertilización durante 24 y 36 h.

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de conejos, según datos del sistema estadístico de La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), reporta que China ocupa el primer lugar a nivel mundial en producción de carne de conejo, seguido de Italia, Venezuela, y Corea. La cunicultura en estos países ha experimentado un gran desarrollo, motivado por la aplicación de tecnologías en la reproducción, donde la evaluación del semen, los métodos de conservación del mismo y la Inseminación Artificial (IA) han permitido una mejora en la producción (FAO, 2010). Sin embargo, México se encuentra en el vigésimo lugar como productor de carne de conejo, con aproximadamente 15 mil toneladas al año, de las cuales 12,500 provienen de producciones de pequeña escala (Márquez Tirado, Alcázar Montañez y Vázquez García, 2019), por lo que la aplicación de tecnologías a nivel reproductivo, permitirá a la cunicultura nacional ser más eficiente y orientarla hacia una actividad empresarial competitiva.

Por otra parte, las características biológicas del conejo, al ser una especie dócil, que ocupa poco espacio, tener un ciclo productivo corto, contar con adaptabilidad, rusticidad y prolificidad, le han permitido ser valorado como animal de producción (para la obtención de carne y piel), así como animal de laboratorio, colaborando en la docencia, investigación y pruebas de constatación de calidad (Díaz Jandete, Vázquez García y Martínez Castillo, 2012).

Por consiguiente, ha sido necesario indagar nuevos métodos para la conservación de semen, que permitan la difusión de machos y hembras de alto valor genético, la aplicación de la Inseminación Artificial (IA) y la preservación de material genético.

Una técnica desarrollada para el mejoramiento genético de los animales de producción es la Inseminación Artificial (IA); la cual consiste en la deposición del semen en aparato reproductor de la hembra por medio de instrumental, con la finalidad de colocar las células sexuales masculinas en el cérvix de la hembra (Alcántar Rodríguez y Jandete Díaz, 2013) su aplicación ha permitido un mejor

manejo y monitoreo de algunas actividades reproductivas y que el germoplasma de machos con un alto potencial genético pueda ser preservado para poder transmitir sus características deseables, siendo una opción para el semen de conejo (Catana León, Balcázar Sánchez y Martínez Castillo, 2014).

A diferencia de otras especies los espermatozoides de conejo presentan una baja permeabilidad al agua y un alto coeficiente de activación de energía (Hernández Ramírez, Herrera Barragán y Felipe Pérez, 2016), por lo que la supervivencia espermática es menor utilizando técnicas de criopreservación (Ferrian, 2007). Actualmente en una producción comercial de conejos, el empleo de la Inseminación Artificial se realiza pocas horas después de haber obtenido el semen y ser diluido (Roca *et al.*, 2000), dentro de este proceso la preservación del semen ha sido limitada, y puede ser atribuible al incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno a causa de un choque térmico (Restrepo Betancur, Pizarro López y Alberto Rojano, 2013), esta susceptibilidad al frío viene determinada por el contenido de colesterol del espermatozoide, que en el caso del conejo contiene el doble de colesterol en sus membranas en comparación con los espermatozoides de bovino y ovino (Darin-Bennett y White, 1977).

Uno de los factores que determinan el éxito de la IA es diluir el semen en fresco usando ingredientes “naturales o sintéticos” que permiten la división del eyaculado en varias dosis. Un extender o extensor por su traducción al español, es aquel que permite diluir el semen y preserve las características biológicas y la viabilidad de los espermatozoides hasta el momento de su utilización (Roca *et al.*, 2000). La mayoría de los extensores se formulan para mejorar la viabilidad del semen durante su conservación; proporcionándole fuentes de energía (glucosa); sales amortiguadoras que evitan fluctuaciones del pH a través de su capacidad tampón (sodio, bicarbonato, Tris hidroximetil aminometano [TRIS]); sales básicas para mantener un adecuado equilibrio osmótico (NaCl, KCl); antimicrobianos para inhibir el crecimiento bacteriano (penicilina, estreptomycin) (De Ambrogi *et al.*, 2006) y crioprotectores para evitar los daños celulares por el enfriamiento (Dimetilsulfóxido, glicerol, etilenglicol, acetamida) (Rodríguez Alvarino 1989).

La leche de vaca ultrapasteurizada, baja en grasas denominada “light” ha demostrado ser un ingrediente eficaz como diluyente para el almacenamiento de semen fresco o refrigerado, la cual es un componente estéril y puede ser utilizada directamente, sin tratamientos adicionales en semen de equino y bovino (Boeta Acosta y Zarco, Quintero, 2000). Además, la leche funciona como un agente crioprotector, ya que se ha señalado que las micelas de caseína y lactosa presentes en ella son responsables de la protección de los espermatozoides durante el almacenamiento en refrigeración y congelamiento de semen de toro y de conejo (Hozbor *et al.*, 2016), debido a que impide la unión de las proteínas presentes en el plasma seminal (BSP) con los espermatozoides, reduciendo la pérdida de los lípidos membranales y deshidratado, y de esta manera se mantiene la movilidad y la viabilidad espermática durante el almacenamiento (Bergeron y Manjunath, 2006).

Por otra parte, a la Jalea Real (JR) es un producto elaborado por las abejas (*Apis mellifera*) secretado por las glándulas hipofaríngeas (localizadas en la cabeza) y mandibulares de las abejas obreras (Viuda-Martos *et al.*, 2008). Se ha informado que su composición química varía de acuerdo a las estaciones y condiciones ecológicas del lugar donde habitan y se alimentan las abejas (Wongchai y Ratanavalachai, 2002). A la JR se le han encontrado propiedades antioxidantes, las cuales son atribuidas a las proteínas y péptidos que esta contiene (Guo *et al.*, 2008), también se ha visto que en la célula, la JR actúa como un eliminador de especies reactivas de oxígeno (Cemek *et al.*, 2010); asimismo, recientes investigaciones han demostrado que la JR puede ser empleada como un aditivo dentro del extender, para mejorar los parámetros de los espermatozoides de borregos y cabras almacenados en refrigeración y congelación; ya que su adición a diferentes concentraciones (0, 0.5, 1, 1.5 y 2%) tiene un efecto protector sobre la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide, mayores porcentajes de motilidad e integridad funcional de la membrana plasmática y menores tasas de acrosomas defectuosos, además de una mayor tasa de viabilidad (Moradi *et al.*, 2013)(Alcay *et al.*, 2017). Sin embargo, no existen trabajos en los que se hayan adicionado jalea real de *Apis mellifera* como un ingrediente para la conservación en refrigeración, del semen de conejo.

HIPÓTESIS

La adición de jalea real a una concentración de 0.5% con leche ultrapasteurizada “light” a muestras de semen de conejo de la raza Nueva Zelanda Blanco, alargará el tiempo de vida de los espermatozoides refrigerados a 4°C y mejorará la fertilidad de conejas inseminadas en comparación con el semen al que no se le adicione jalea real.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la jalea real a una concentración de 0.5% con leche ultrapasteurizada “light”, para la conservación en refrigeración (4°C) de semen de conejo Nueva Zelanda Blanco.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México. El CEIEPAv se localiza en la calle Manuel M. López S/N en la Colonia Santiago Zapotitlán en la alcaldía Tláhuac, en la Ciudad de México.

ANIMALES

Se utilizaron tres machos reproductores de la raza Nueva Zelanda Blanco, clínicamente sanos y con una edad de entre seis meses a dos años de los cuales se obtuvieron y evaluaron 8 muestras seminales. Estos animales se encontraban previamente entrenados para la obtención de muestras de semen mediante el uso de la vagina artificial; y eran alojados individualmente en una jaula de tipo modular, dentro de una caseta de ambiente natural, con ventilación controlada y cortinas laterales.

Para la inseminación artificial se utilizaron 32 hembras reproductoras de la raza Nueva Zelanda Blanco, con una edad mayor a los 4 meses y clínicamente sanas; estas se encuentran en una caseta diferente con las mismas condiciones ambientales, cada hembra está alojada individualmente en jaulas tipo americanas, dispuestas en “flat-deck”.

Todas las jaulas se encuentran equipadas con comederos tipo tolva, bebederos automáticos; a todos los animales, se les proporcionó alimento comercial peletizado de acuerdo con su estado fisiológico, con la finalidad de evitar el sobrepeso, el agua se ofreció a libre acceso.

COLECCIÓN Y EVALUACIÓN DE SEMEN

La obtención del semen se realizó con una vagina artificial adaptada, la cual consiste en un cuerpo cilíndrico de plástico rígido; en el interior contiene un revestimiento de látex, formando un espacio, mismo que es utilizado para contener agua caliente que permite alcanzar la temperatura apropiada (42°C) y formar presión para la eyaculación; la vagina artificial tiene dos aberturas; en una de ellas se coloca un tubo recolector y en la otra permite la introducción del pene. Posteriormente, con el apoyo de una piel curtida de conejo colocada en el antebrazo, se estimuló al semental para la monta la cual se logró, permitiendo así la eyaculación dentro de la vagina, siendo depositada en el otro extremo en un tubo Falcon estéril de 15 ml. La colección de semen se realizó cada 7 días entre las 7 y 8 am, tomando el primer eyaculado (Fotografía 1) donde se obtuvieron 8 muestras seminales.

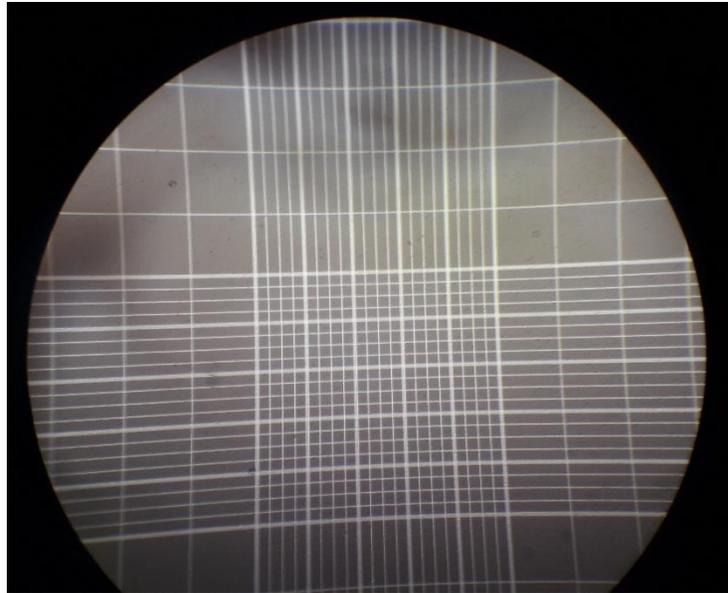


Fotografía 1 Recolección de semen con vagina artificial

Una vez colectado el semen se determinó su calidad, mediante la evaluación macroscópica (observación directa de la muestra) (Fotografía 2), midiendo el volumen, el aspecto general del semen, identificando el color y la presencia o ausencia de la fracción gelatinosa del semen; en caso de que esta se encontrara presente, se retiraba. En la evaluación microscópica, se evaluó la motilidad masal e individual de los espermatozoides; además se realizó el cálculo de la concentración espermática usando la cámara de Neubauer (Fotografía 3). Una vez evaluado el semen, fue diluido para obtener dosis e inseminar a las hembras a una concentración de 20 millones de espermatozoides en un volumen de 0.5 ml.

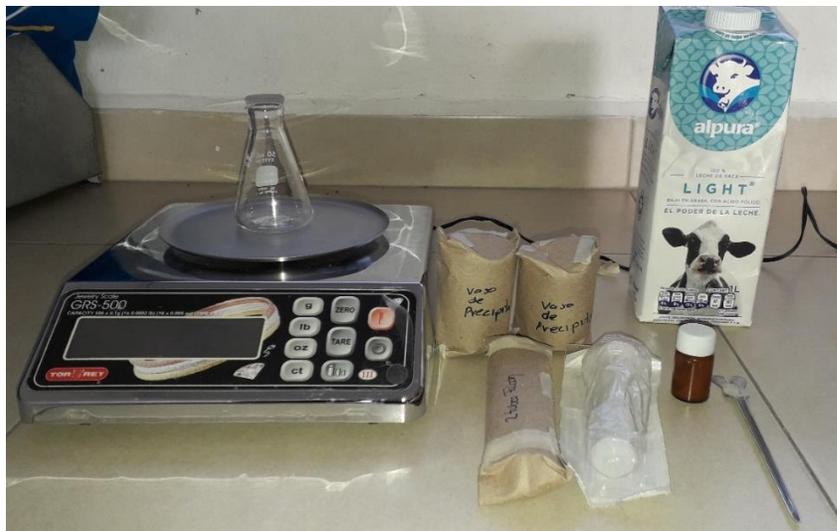


Fotografía 2: Evaluación macroscópica de semen colectado

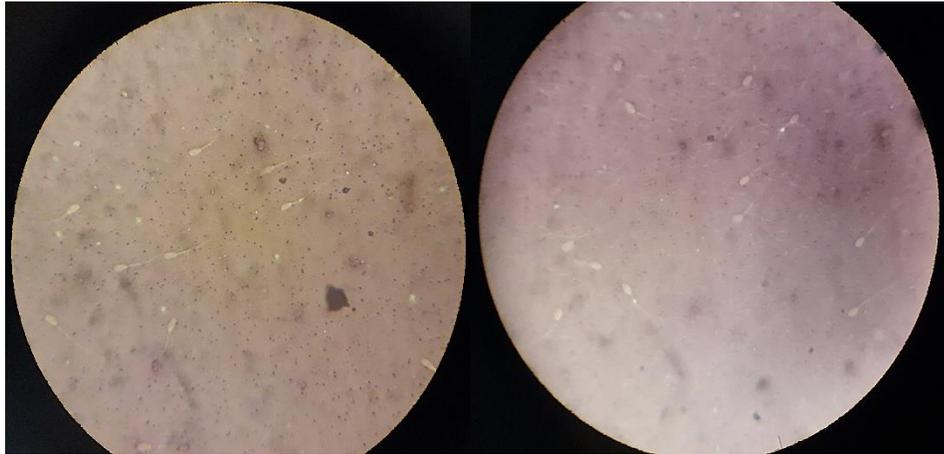


Fotografía 3: Cámara de Neubauer en objetivo 10x

La elaboración del diluyente se realizó con leche ultrapasteurizada “light” y se le agregó jalea real a una concentración de 0.5% (Fotografía 4). Cada muestra fue conservada en refrigeración a una temperatura de 4°C durante 24 y 36 horas; y posteriormente se les realizó la tinción de eosina y nigrosina, para evaluar el número de espermatozoides vivos y muertos (Fotografía 5).



Fotografía 4 Material para la elaboración de diluyente con leche ultrapasteurizada light con y sin Jalea Real



Fotografía 5: Tinción eosina y nigrosina; evaluación de espermatozoides vivos y muertos

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Para la inseminación artificial se utilizaron 32 hembras reproductoras con una edad superior a los 4 meses y clínicamente sanas; estas 32 hembras fueron elegidas de manera aleatoria y divididas en grupos de 4. Para poder realizar la IA se llevó a cabo un tratamiento de sincronización del estro; a cada hembra de los diferentes grupos se les aplicó Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) (Novormon 5000 ®) por vía intramuscular, a una dosis de 30 UI/Coneja y 48 horas después se hizo la inseminación artificial.

Para poder inseminar a las hembras se procedió a observar la coloración de la vulva para verificar la receptividad , resultando efectiva (Fotografía 5); posteriormente se realizó la técnica de IA para lo cual se sostuvo a la coneja de decúbito supino y el operador separó los labios vulvares e introdujo la pipeta de inseminación artificial de manera que el extremo curvo de la pipeta fuera dirigido hacia la columna; para evitar su introducción a la uretra, la pipeta se giró suavemente en 180° y se introdujo unos centímetros más (8 a 14 centímetros) y hasta llegar a los cervix se presionó gentilmente el émbolo de la jeringa y se depositó el semen (Fotografías 6 y 7). Una vez terminada la técnica de IA, y ya que no existen los estímulos que el macho

provoca en la hembra durante la cópula, fue necesario inducir la ovulación, por lo que se aplicó Gonadolerina (análogo de GnRH), a dosis de 20 µg /coneja por vía intramuscular profunda.



Fotografía 6: Revisión de la receptividad de la coneja



Fotografía 7: Inseminación artificial en la coneja



Fotografía 8: Inseminación artificial en la coneja

Las 32 conejas inseminadas se dividieron en 4 grupos de 8 hembras cada uno; en cada grupo se inseminaron a hembras con las muestras conservadas durante 24 horas con y sin JR, y a hembras con las muestras conservadas durante 36 horas con y sin JR; de tal manera que los tratamientos quedaron distribuidos en la siguiente forma:

1. Conejas inseminadas a las 24 h con leche ultrapasteurizada light
2. Conejas inseminadas a las 24 h con leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%
3. Conejas inseminadas a las 36 h con leche ultrapasteurizada light
4. Conejas inseminadas a las 36 h con leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%

Antes de realizar la IA con cada una de las muestras, se elaboró la tinción con Eosina y Nigrosina (Eosina amarillenta 2; Nigrosina 10) en frotis, para comprobar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos; para la obtención de estos datos, se contaron 100 espermatozoides de diferentes zonas de la laminilla, para su posterior análisis estadístico.

Para la obtención de los datos de fertilidad (hembra gestante o no gestante) en cada una de las hembras, se realizó el diagnóstico de gestación por medio de palpación abdominal a los 13 días de haber aplicado la técnica de IA; mientras que el número de gazapos nacidos totales fue obtenido al momento del parto de cada coneja.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Las variables por evaluar fueron: Hembra gestante o no gestante, el número de gazapos nacidos y el total de espermatozoides vivos y muertos; los datos obtenidos se analizaron con el programa IBM SPSS 25 ®, en el cual se estableció como variable categórica Hembra gestante y no gestante donde se utilizó la Prueba de *ji-cuadrada*; mientras que para las variables cualitativas como fueron el número de gazapos nacidos y el total de espermatozoides vivos y muertos fueron evaluadas mediante análisis de varianza y comparados por medio de pruebas T de Student; en el caso de las muestras relacionadas (24 y 36 horas de conservación) se utilizaron pruebas de comparaciones pareadas.

RESULTADOS

Para la variable “Hembra gestante y no gestante” se registró un mejor porcentaje en el grupo inseminado con el diluyente de leche ultrapasteurizada light (68.75% 11/16) que en el grupo inseminado con el diluyente de leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5% (50% 8/16), esta diferencia no resulta estadísticamente significativa ($P=0.280$) (Cuadro 1).

Cuadro 1

Porcentaje de hembras gestantes y no gestantes inseminadas con los dos extenders, independientemente de la hora de inseminación artificial

Tratamiento	Total	Diagnósticos de gestación negativos		Diagnósticos de gestación positivos	
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Leche ultrapasteurizada light	16	5	31.25 %	11	68.75 %
Leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%	16	8	50 %	8	50 %
Global	32	13	40.6 %	19	59.4 %

Chi-cuadrado= 1.16

Para la variable “número de gazapos nacidos” se obtuvo un mayor número utilizando como extender la leche ultrapasteurizada light ($\mu=4.25$) que en el grupo con JR al 0.5% ($\mu= 4.13$). Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa ($P=0.939$) (Cuadro 2).

Así mismo, se realizó otro análisis estadístico tomando en cuenta las horas de conservación del semen, donde se obtuvo un mayor número de gazapos nacidos en las muestras conservadas durante 36 h ($\mu=4.50$), mientras que en las muestras conservadas durante 24 h fue menor ($\mu=3.88$); sin embargo, con estos resultados no se encontró evidencia estadística suficiente para decir que el número de nacidos es diferente para las muestras conservadas durante 24 y 36 h ($p=.647$) (Cuadro 3).

Cuadro 2

Análisis del número de gazapos nacidos por grupo de extenders usado, independientemente de la hora de inseminación artificial

Extender	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	Significancia estadístico T
Leche ultrapasteurizada light	4.25	4.219	2.00-6.50	0.939
Leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%	4.13	4.897	1.52-6.73	

Cuadro 3

Análisis estadístico del número de gazapos nacidos utilizando dos extenders conservados durante 24 y 36 h

Horas de conservación	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	Significancia estadístico T
24 horas	3.88	3.998	1.74-6.01	0.647
36 horas	4.50	5.060	1.80-7.20	

Por otra parte, realizando el análisis estadístico para el número de espermatozoides vivos, muertos, y totales se pudo observar que hay evidencia estadística suficiente para afirmar que el promedio de espermatozoides vivos es mayor utilizando como extender la leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5 % ($77.81 \geq 70.69$) ($p=0.041$), (Cuadro 4). En cuanto a el promedio de espermatozoides muertos se pudo observar que hay una menor cantidad utilizando como extender leche ultrapasteurizada light y JR al 0.05% ($20.00 \leq 24.94$) sin embargo, no se encuentra evidencia estadística suficiente para concluir que el promedio de espermatozoides es menor utilizando este extender, que la leche ultrapasteurizada light ($p=0.09$) (cuadro 4).

Cuadro 4

Medidas descriptivas del número de espermatozoides vivos, muertos y contados, utilizando dos extenders, independientemente de la hora de inseminación artificial

Variable	Extender	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	Significancia estadístico T
Total vivos	Leche ultrapasteurizada light	70.69	13.225	63.64 - 77.73	0.041*
	Leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%	77.81	8.666	73.19 - 82.43	
Total muertos	Leche ultrapasteurizada light	24.94	12.019	18.53 - 31.34	0.09
	Leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%	20.00	8.414	15.52 - 24.48	
Total de células contadas	Leche ultrapasteurizada light	101.19	2.588	99.81 - 102.57	0.406
	Leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%	101.44	3.306	99.68 - 101.44	0.406

(*) Diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$)

Continuando el análisis estadístico de los espermatozoides vivos, muertos y totales se tomó en cuenta las horas de conservación del semen en ambos extenders, sin embargo, en ninguna de las variables antes mencionadas se encontró evidencia estadística suficiente para concluir que el número de espermatozoides vivos, muertos y totales conservados durante 24 y 36 horas es diferente en alguno de los extenders utilizados (Cuadro 5)

Cuadro 5

Medidas descriptivas del número de espermatozoides, vivos, muertos y totales utilizando dos extenders conservados durante 24 y 36 h

Extender	Variable y conservación	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza al 95%	Significancia estadístico T
1	Vivos (24 h)	69.25	13.225	58.15 – 80.13	0.526
	Vivos (36 h)	72.13	13.923	60.49 – 83.76	
	Muertos (24 h)	27.13	12.438	16.73 – 37.52	0.325
	Muertos (36 h)	22.75	11.997	12.72 – 32.78	
	Totales (24 h)	102.0	3.505	99.07 – 104.93	0.226
	Totales (36 h)	100.3	.744	99.75 – 101.00	
2	Vivos (24 h)	79.5	6.761	73.85 – 85.15	0.367
	Vivos (36 h)	76.13	10.426	67.41 – 84.84	
	Muertos (24 h)	19.25	8.714	11.97 – 26.53	0.681
	Muertos (36 h)	20.75	8.631	13.53 – 27.97	
	Totales (24 h)	102.13	4.518	98.35 – 105.90	0.470
	Totales (36 h)	100.75	1.389	99.59 – 101.91	

(1) Leche ultrapasteurizada light

(2) Leche ultrapasteurizada light y JR al 0.5%

DISCUSIÓN

Si bien la técnica de IA se desarrolla a partir de los años ochenta en Europa y es implementada especialmente para el mejoramiento genético de los animales domésticos (Martínez Castillo, 2004), es una herramienta que ha permitido un mejor manejo y monitoreo de las actividades reproductivas, como es el control de la calidad del semen, la disminución de las enfermedades transmitidas por el coito, una mejor utilización de sementales, la adquisición de dosis de semen de animales valiosos y la difusión de este material genético (González, 2005; Rodríguez Alvarino, 1989; Hafez y Hafez, 2000). Sin embargo, el uso exitoso de algunos extensores en varias especies domésticas no ha tenido los mismos efectos en la cunicultura; por lo que se han buscado alternativas y adaptaciones a las fórmulas utilizadas. Teniendo en cuenta la experiencia en el manejo y la conservación del semen de machos de otras especies, en el presente trabajo se comparó la utilidad como extender de la leche ultrapasteurizada “light” con y sin jalea real, con las concentraciones ya especificadas dentro de la metodología. En estudios previos se han demostrado que la leche de vaca ultrapasteurizada “light” puede ser utilizada sin tratamientos previos como diluyente para el almacenamiento en refrigeración de semen fresco y congelado de toro, conejo y burro (Hozbor *et al.*, 2016; Boeta Acosta y Zarco, Quintero, 2000). Hozbor y colaboradores mostraron resultados donde el semen de conejo diluido en leche descremada ultrapasteurizada y conservado durante 24 horas a temperatura ambiente, donde se observó una mayor motilidad total, membrana plasmática intacta y funcional así como un mayor número de embriones recuperados en conejo, en comparación con los que se conservaron en solución salina (Hozbor *et al.*, 2016); el análisis estadístico en el presente estudio no se observó diferencia estadística significativa entre la proporción de hembras gestantes atribuible al extender del semen ($P \geq 0.05$), por ello podemos mencionar que ambos medios permitieron conservar el semen de conejo y mantener su capacidad de fertilización durante 24 y 36 h refrigerado a 4°C.

Una estrategia para mejorar la calidad del semen durante los procesos de almacenamiento, podría ser la adición de los extenders, al respecto algunos estudios informan el efecto de la JR en la calidad del semen de ciertos animales domésticos; el presente trabajo demostró la capacidad protectora de la JR cuando se agrega a la leche ultrapasteurizada “light”, en el espermatozoide de conejo, ya que se pudo observar que la viabilidad de los espermatozoides en las muestras almacenadas durante 24 y 36 h a 4°C con leche ultrapasteurizada “light” y JR al 0.5% fue mayor ($77.81 \geq 70.69$); los resultados de esta investigación indicaron algunos de los efectos protectores de la JR sobre los espermatozoides de conejo al estar conservados en refrigeración a 4°C durante 24 y 36 horas. Estudios anteriores evaluaron el efecto de la adición de JR como extender e informaron resultados similares, sin embargo, las horas de conservación reportadas en algunos de estos estudios fueron diferentes. Moradi y colaboradores informaron que la viabilidad de los espermatozoides de cabra complementados con 0.5% de JR resultó con un notable aumento, en comparación con las muestras que no fueron complementadas (Moradi *et al.*, 2013); del mismo modo, la adición al 0.5% de jalea real a extenders a base de lectina de soya en espermatozoides de cabra, demostró tener una mayor tasa de viabilidad, posterior a la descongelación en comparación con los grupos a los que no se les adicionó jalea real (Alcay *et al.*, 2017); igualmente, se evaluó el efecto de la JR sobre la calidad espermática del semen de búfalo, los resultados indicaron que la viabilidad espermática, la membrana plasmática y la integridad del acrosoma, mejoraron significativamente ($P < 0.05$) en el grupo suplementado con 0.1% de JR en comparación con los otros grupos de tratamiento (Shahzad *et al.*, 2016); asimismo, Iljenkaite y colaboradores evaluaron la viabilidad de los espermatozoides de verraco con un extender a largo plazo complementado con diferentes concentraciones de JR, demostrando que las concentraciones de 0.5 y 1% fueron capaces de proteger la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides en almacenamiento en líquido durante 96 h a 16°C. (Iljenkaite *et al.*, 2020). Por todo lo anterior, la protección de los espermatozoides durante el proceso de enfriamiento por la adición de JR podría atribuirse a su composición química y, en particular, a sus proteínas, las cuales representan el contenido más

importante de la JR y son llamadas Proteínas Mayores de la Jalea Real (MRJPs por su nombre en inglés) y a sus aminoácidos biológicamente activos entre los que se encuentran: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina; componentes a los que son atribuidos la propiedad antioxidante de la JR (Maghsoudlou *et al.*, 2019); asimismo, su contenido de vitaminas (A, E, D, C y del complejo B) y sales minerales (Na, K, Ca, Mg, Na, P) que desempeñan un papel importante en la preservación de la integridad de la membrana espermática (Bărnuteiu *et al.*, 2011; Alcay *et al.*, 2017).

Además, el principal ácido graso de la JR es el ácido 10-HDA al cual se le ha atribuido efectos antibióticos y antifúngicos (Maghsoudlou *et al.*, 2019); en el estudio actual, el extensor de base se preparó sin antibióticos; por lo tanto, los efectos positivos de JR sobre calidad del espermatozoide durante el almacenaje se pueden relacionar también con la actividad antimicrobiana de la JR.

CONCLUSIONES

1. Se logró el objetivo de evaluar el efecto de la jalea real a una concentración de 0.5% con leche ultrapasteurizada "light", para la conservación en refrigeración (4°C) de semen de conejo Nueva Zelanda Blanco obteniéndose un mayor número de espermatozoides vivos en comparación, con los que no contenían JR.
2. Por otra parte, ambos medios con y sin JR permitieron conservar el semen de conejo y mantener su capacidad de fertilización durante 24 y 36 h refrigerado a 4°C, lo cual constituye una mejora en el tiempo de conservación del semen de conejo
3. Se sugiere la realización de más investigaciones al respecto de la conservación de semen de conejo, utilizando concentraciones más bajas de JR y para hacer un mejor aprovechamiento de la técnica de inseminación artificial para impulsar el mejoramiento genético en la producción cunícola.

REFERENCIAS

Alcántar Rodríguez, V. y Jandete Díaz, H. (2013) *Inducción de la ovulación con monta natural utilizando machos vasectomizados o análogo sintético de GnRH en conejos Nueva Zelanda Blanco*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zooyecnia.

Alcay, S., Toker, M. B., Onder, N. T. y Gokce, E. (2017) "Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa", *Cryobiology*. Elsevier Ltd, 74, pp. 81–85. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.11.011.

De Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., Caballero, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Andersson, M. y Rodriguez-Martinez, H. (2006) "Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa", *International Journal of Andrology*, 29(5), pp. 543–552. doi: 10.1111/j.1365-2605.2006.00694.x.

Bărnăuțiu, L. I., Mărghițaș, L. A., Dezmirean, D. S., Mihai, C. M. y Bobiș, O. (2011) "Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Royal Jelly - Review", *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 44(2), pp. 67–72. Disponible en: <http://spasb.ro/index.php/spasb/article/view/552>.

Bergeron, A. y Manjunath, P. (2006) "New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk", *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), pp. 1338–1344. doi: 10.1002/mrd.20565.

Boeta Acosta, M. y Zarco, Quintero, L. (2000) "Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas", *Revista Verinaria México*, pp. 67–69.

Catana León, J. L., Balcázar Sánchez, J. A. y Martínez Castillo, M. A. (2014) *Comparación de la Fertilidad de conejas criollas inseminadas artificialmente con semen congelado usando 2 diferentes medios (amidas con lipoproteínas de baja densidad vs amidas y yema de huevo).pdf*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cemek, M., Aymelek, F., Büyükokuroğlu, M. E., Karaca, T., Büyükben, A. y Yilmaz, F. (2010) "Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels", *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), pp. 2827–2832. doi: 10.1016/j.fct.2010.07.013.

Darin-Bennett, A. y White, I. G. (1977) "Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock", *Cryobiology*. Academic Press, 14(4), pp. 466–470. doi: 10.1016/0011-2240(77)90008-6.

Díaz Jandete, H., Vázquez García, M. del C. y Martínez Castillo, M. Á. (2012) *Manual de Prácticas de Medicina y Zootecnia Cunícola I*. Primera Ed. México,

Distrito Federal. Disponible en: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual de Practicas de Medicina y Zootecnia Cunicula II.pdf.

FAO (2010) "Reproductive and molecular biotechnology", en *La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura*, pp. 289–298. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a1250s/a1250s13.pdf>.

Ferrián, S. (2007) *Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación*. Disponible en: <http://riunet.upv.es/handle/10251/12203>.

González, U. R. (2005) "Bioestimulación en la coneja reproductora. Alternativas a los tratamientos hormonales", *Cunicultura*, febrero, pp. 7–16.

Guo, H., Ekusa, A., Iwai, K., Yonekura, M., Takahata, Y. y Morimatsu, F. (2008) "Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo", *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 54(3), pp. 191–195. doi: 10.3177/jnsv.54.191.

Hafez, B. y Hafez, E. S. E. (2000) *Reproduction in farm animals*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins. Disponible en: <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001002014446&lang=es&site=eds-live>.

Hernández Ramírez, M., Herrera Barragán, J. A. y Felipe Pérez, Y. E. (2016) *Comparación de la conservación In Vitro y capacidad fertilizante In Vivo del semen de conejo refrigerado con dos diluyentes*. Universidad Autónoma Metropolitana.

Hozbor, F., Ledesma, A., Manes, J., Ríos, G. L., Kaiser, G., Cano, A., Luciano, C. y Alberio, R. (2016) "Improve intra-uterine insemination in rabbits using ultra-high temperature skim milk as extender to keep semen at room temperature", *Andrologia*, 48(2), pp. 231–234. doi: 10.1111/and.12445.

Iļjenkaite, A., Kerziene, S., Dauksiene, A., Mikniene, Z., Zilinskas, H. y Sutkeviciene, N. (2020) "The effect of royal jelly on boar sperm viability and motility during liquid storage for 96 hours", *Acta Veterinaria Brno*, 89(1), pp. 47–53. doi: 10.2754/avb202089010047.

Maghsoudlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Mohebodini, H. y Toldra, F. (2019) "Royal jelly: Chemistry, storage and bioactivities", *Journal of Apicultural Science*, 63(1), pp. 17–40. doi: 10.2478/jas-2019-0007.

Márquez Tirado, C., Alcázar Montañez, C. y Vázquez García, M. del C. (2019) *Efecto de las buenas prácticas de manufactura y procedimientos de saneamiento en el procesamiento de canales de conejo del C.E.I.E.P.Av.* Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Disponible en: <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02029a&AN=tes.TES01000797447&lang=es&site=eds-live>.

Martínez Castillo, M. Á. (2004) *Cunicultura*. 2a ed. UNAM, Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, División de Educación Continua. Disponible en: <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001001057032&lang=es&site=eds-live>.

Moradi, A. R., Malekinejad, H., Farrokhi-Ardabili, F. y Bernousi, I. (2013) "Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source", *Small Ruminant Research*. Elsevier B.V., 113(2–3), pp. 346–352. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.03.003.

Restrepo Betancur, G., Pizarro López, E. y Alberto Rojano, B. (2013) "Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado", *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), pp. 128–136.

Roca, J., Martínez, S., Vázquez, J. M., Lucas, X., Parrilla, I. y Martínez, E. A. (2000) "Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C", *Animal Reproduction Science*, 64(1–2), pp. 103–112. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00185-8.

Rodríguez Alvarino, M. (1989) *Control de la reproducción en el conejo*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Disponible en: <http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001000700205&lang=es&site=eds-live>.

Shahzad, Q., Mehmood, M. U., Khan, H., Husna, A. ul, Qadeer, S., Azam, A., Naseer, Z., Ahmad, E., Safdar, M. y Ahmad, M. (2016) "Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm", *Animal Reproduction Science*. Elsevier B.V., 167, pp. 83–88. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.02.010.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. y Pérez-Álvarez, J. A. (2008) "Functional properties of honey, propolis, and royal jelly", *Journal of Food Science*, 73(9), pp. 117–124. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x.

Wongchai, V. y Ratanavalachai, T. (2002) "Seasonal variation of chemical composition of royal jelly produced in Thailand", *Thammasat International Journal of Scientific Technology*, 7(2), pp. 1–8.