



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**CARACTERIZACIÓN DE SEMEN DE ZÁNGANO Y
EFECTO DE LA JALEA REAL EN LA CRIO PRESERVACIÓN
DE LOS ESPERMATOZOIDES**

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

AUTOR: CARLOS FERNANDO ENRÍQUEZ DUMA

JONATHAN SANTIAGO LALVAY QUEZADA

DIRECTOR: Mgs. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**CARACTERIZACIÓN DE SEMEN DE ZÁNGANO Y EFECTO DE LA
JALEA REAL EN LA CRIO PRESERVACIÓN DE LOS
ESPERMATOZOIDES**

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO**

AUTOR: CARLOS FERNANDO ENRÍQUEZ DUMA

JONATHAN SANTIAGO LALVAY QUEZADA

DIRECTOR: Mgs. DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

DECLARACIÓN

Carlos Fernando Enríquez Duma portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105623466** y **Jonathan Santiago Lalvay Quezada** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105936900**. Declaramos ser autores de la obra: “**CARACTERIZACIÓN DE SEMEN DE ZÁNGANO Y EFECTO DE LA JALEA REAL EN LA CRIO PRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES**”, sobre la cual nos responsabilizamos sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaramos que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaramos finalmente que nuestra obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también nos responsabilizamos y eximimos a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **9 de agosto de 2023**



Carlos Fernando Enríquez Duma
C.I. **0105623466**



Jonathan Santiago Lalvay Quezada
C.I. **0105936900**

CERTIFICACIÓN

Yo Daniel Ernesto Argudo Garzón, con cedula de identidad N° 0104461165 en calidad de Director del trabajo de Titulación con el tema: **"CARACTERIZACIÓN DE SEMEN DE ZÁNGANO Y EFECTO DE LA JALEA REAL EN LA CRIO PRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES"**, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por CARLOS FERNANDO ENRÍQUEZ DUMA y JONATHAN SANTIAGO LALVAY QUEZADA, bajo mi supervisión



Firmado electrónicamente por:
DANIEL ERNESTO
ARGUDO GARZON

Mgs. Daniel Ernesto Argudo Garzón
DIRECTOR

DEDICATORIA

Nuestra tesis la dedicamos a nuestros padres ya que son el pilar fundamental en nuestra vida, agradecemos su sacrificio y esfuerzo durante nuestra formación académica, gracias por confiar y apoyarnos en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis primeramente agradecemos a Dios por ser mi padre celestial, el que nos guía y cuida a cada uno de los pasos dados diariamente.

Queremos agradecer al director de tesis Mag Daniel Ernesto Argudo Garzón, por aceptar realizar esta tesis, agradezco su generosidad, esfuerzo y dedicación ya que, con sus conocimientos, experiencias, motivación que nos brindó hemos conseguido un buen aprovechamiento en el trabajo de titulación.

Quiero agradecer a todos los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Católica de Cuenca, quienes fueron los mejores guías de mi largo recorrido y por brindarme su apoyo en cada obstáculo, durante estos 5 años de formación académica.

Agradezco especialmente al Ing. Manuel Maldonado, Dra. Dina Maricela Veloz Veloz y Ing. Juan Carlos Alvarado Alvarado por brindarnos su ayuda y apoyo al compartir todos sus conocimientos, experiencias y enseñanzas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	- 12 -
ABSTRACT.....	- 13 -
INTRODUCCIÓN.....	- 14 -
OBJETIVOS.....	- 16 -
Objetivo General.....	- 16 -
Objetivos específicos.....	- 16 -
1 CAPÍTULO 1.....	- 17 -
MARCO TEÓRICO.....	- 17 -
1.1 Apicultura.....	- 17 -
1.2 La colmena.....	- 17 -
1.3 Zángano.....	- 18 -
1.4 Anatomía del aparato reproductor del macho.....	- 18 -
1.5 Fisiología del aparato reproductor del macho.....	- 19 -
1.5.1 Testículos.....	- 19 -
1.5.2 Vesícula seminal.....	- 19 -
1.5.3 Glándulas mucosas.....	- 20 -
1.5.4 Canal eyaculador.....	- 20 -
1.5.5 Órgano Copulador.....	- 20 -
1.6 Características del eyaculado.....	- 20 -
1.6.1 Semen de zángano.....	- 20 -
1.7 Colecta del semen.....	- 20 -
1.8 Análisis macroscópico del semen.....	- 22 -
1.8.1 Volumen eyaculado.....	- 22 -
1.8.2 Color y pH seminal.....	- 22 -
1.9 Análisis microscópico del semen.....	- 23 -
1.9.1 Concentración espermática.....	- 23 -
1.9.2 Motilidad espermática.....	- 23 -
1.9.3 Viabilidad espermática.....	- 23 -
1.9.4 Morfología del espermatozoide.....	- 24 -
1.10 Técnicas para la evaluación de la vitalidad espermática.....	- 25 -
1.10.1 Eosina - Nigrosina.....	- 25 -
1.10.2 Test hipoosmótico (HOST).....	- 25 -
1.10.3 Yoduro de propidio.....	- 25 -

1.10.4	Hoechst	- 25 -
1.11	Métodos de conservación de espermatozoides	- 26 -
1.11.1	Principios de la criopreservación	- 26 -
1.11.2	Semen fresco	- 26 -
1.11.3	Semen congelado	- 26 -
1.11.4	Agentes crioprotectores (ACP)	- 27 -
1.11.5	Diluyentes	- 27 -
1.12	Jalea real	- 27 -
1.12.1	Propiedades antioxidantes de la jalea real.	- 27 -
2	CAPITULO 2	- 29 -
	METODOLOGÍA.....	- 29 -
2.1	Tipo de estudio	- 29 -
2.2	Materiales.....	- 29 -
2.2.1	Materiales de campo	- 29 -
2.2.2	Materiales de Laboratorio	- 29 -
2.2.3	Materiales químicos	- 30 -
2.3	Variables	- 30 -
2.3.1	Variables independientes	- 30 -
2.3.2	Variable de inclusión	- 30 -
•	Volumen	- 30 -
2.3.3	Variables intervinientes	- 30 -
2.3.4	Variable Dependiente	- 30 -
2.4	Área de estudio.....	- 31 -
2.5	Diseño del Experimento	- 31 -
2.6	Universo de estudio	- 32 -
2.7	Procedimiento.....	- 32 -
2.8	Procedimiento de laboratorio.....	- 32 -
2.9	Análisis Estadístico	- 39 -
2.10	Cuadros Estadísticos.....	- 40 -
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 42 -
3.1	RESULTADOS.....	- 42 -
3.2	DISCUSIÓN	- 43 -
4	CONCLUSIONES	- 46 -
5	RECOMENDACIONES.....	- 47 -
6	BIBLIOGRAFÍA.....	- 48 -
7	ANEXOS	- 53 -

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Ciclo de vida de la abeja <i>Apis mellifera</i> L.	- 17 -
Fig. 2 Zángano (<i>Apis mellifera</i> L.)	- 18 -
Fig. 3 Anatomía interna de abdomen de un zángano joven.....	- 19 -
Fig. 4 Eversión del endófalo.	- 21 -
Fig. 5 Presentación del semen.	- 22 -
Fig. 6 Estructura del espermatozoide	- 24 -
Fig. 7 Mapa geográfico de la parroquia Sinincay	- 31 -
Fig. 8 Eversión total del endófalo	- 33 -
Fig. 9 Equipo casero adaptado para la colecta de semen	- 33 -
Fig. 10 Diferenciación entre semen (b) y mucus (a).....	- 34 -
Fig. 11 Colecta del semen observado a través del estereoscopio.	- 34 -
Fig. 12 Curva de congelación de semen de zángano	- 36 -
Fig. 13 Placa de motilidad masal vista al microscopio con lente de 40x.....	- 37 -
Fig. 14 Placa de frotis con test de HOST vista al microscopio lente de 40x.	- 38 -
Fig.15 Frotis de espermatozoides con tinción de eosina-nigrosina	- 38 -
Fig. 16 Placa con tinción dual Yoduro de Propidio y Hoechst	- 39 -
Fig. 17 La morfología normal de los espermatozoides.	- 43 -

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Morfología espermática (Eosina-Nigrosina)	- 40 -
Cuadro 2. HOST (Permeabilidad de la membrana).....	- 40 -
Cuadro 3. Evaluación Viabilidad espermática (Yoduro Propidio/Hoechst)	- 40 -
Cuadro 4. Evaluación de la Motilidad individual	- 41 -
Cuadro 5. Evaluación del Vigor	- 41 -
Cuadro 6. Eficiencia de la colecta	- 42 -
Cuadro 7. Resumen Estadístico.....	- 42 -

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Entrevista al señor Hipólito Alberca	- 53 -
Anexo 2. Captura y traslado de los zánganos.	- 53 -
Anexo 3. Análisis de semen fresco	- 54 -
Anexo 4. Proceso de empajillado las muestras para la criopreservación	- 54 -
Anexo 5. Colocación de las pajuelas para la criopreservación	- 55 -
Anexo 6. Cámara de criogenización con las muestras.	- 55 -
Anexo 7. Análisis post descongelación de las muestras espermáticas	- 56 -

RESUMEN

Las poblaciones de polinizadores en especial las abejas han evidenciado un declive significativo debido a los cambios ambientales y el uso irracional de pesticidas afectando en el número de colmenas a nivel mundial, causando una reducción en servicio de polinización que brindan, desencadenando un bajo rendimiento agrícola que pone en riesgo la seguridad alimentaria. La criopreservación brinda la posibilidad de preservar las especies, es por ello que, planteamos como objetivo evaluar el efecto de la adicción de jalea real en la criopreservación de espermatozoides de zángano, para lo cual, se extrajo muestras seminales de 396 zánganos, inicialmente se caracterizó el semen fresco como punto de partida, posteriormente se prepararon dos tratamientos; T1 DMSO como crioprotector más diluyente a base de TCG (tris, ácido cítrico, glucosa) adicionado yema de huevo suplementado con 1% jalea, y T2 sin suplementación de jalea (control), muestras que fueron criopreservadas para evaluar la calidad seminal post descongelación. Los resultados obtenidos reflejan una eficiencia de colecta espermática del 38.4% y un volumen promedio de eyaculado de 0,8 μ L con una concentración espermática de $2,8 \pm 0.43 \times 10^6$, además, expresaron una significancia para la variable de morfología mientras que, las variables de motilidad, integridad de la membrana y viabilidad no registraron diferencias significativas, los datos fueron sometidos a la prueba estadística T Student. En conclusión, los datos post criopreservación de semen de zángano reflejan beneficio limitado, sin embargo, para optimizar los resultados es preciso experimentar con la inclusión de porcentajes distintos a los empleados en este estudio.

Palabras clave: Apis Mellifera, zángano, criopreservación, morfología espermática.

ABSTRACT

Pollinator populations, particularly bees, have significantly declined due to environmental changes and the indiscriminate use of pesticides, affecting the number of hives worldwide. This has decreased their pollination service, triggering a low agricultural yield that jeopardizes food security. Cryopreservation offers a potential solution for species preservation. Therefore, this study aims to evaluate the effect of adding royal jelly to the cryopreservation of drone spermatozoa, for which seminal samples were extracted from 396 drones. Initially, the fresh semen was characterized as a starting point; then two treatments were prepared; T1 DMSO as a cryoprotectant along with a TCG-based diluent (tris, citric acid, glucose) containing egg yolk supplemented with 1% jelly, and T2 without jelly supplementation (control). These samples were cryopreserved to evaluate seminal quality after thawing. The results obtained indicated a 38.4% sperm collection efficiency and an average ejaculate volume of 0.8 μ L, with a sperm concentration of $2.8 \pm 0.43 \times 10^6$. In addition, significance for the morphology variable was expressed, while the motility, membrane integrity, and viability variables showed no significant differences. The data were subjected to the Student's T-test. In conclusion, the post-cryopreservation data of drone semen revealed limited benefits; however, experimentation with the inclusion of percentages other than those used in this study is necessary to optimize the results.

Keywords: *Apis Mellifera*, drone, cryopreservation, sperm morphology.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, evidenciamos un declive en la población de polinizadores ya sea silvestres o domésticos y paralelamente una disminución en las plantas que polinizan, los descensos registrados son muy significativos, manifestando importantes repercusiones no solo ecológicas, sino también económicas, ya que, ponen en riesgo la seguridad alimentaria y por ende el bienestar humano (Rhodes., 2018).

Los polinizadores, particularmente las abejas, prestan un servicio ecosistémico que favorece directamente a la producción agrícola y a la fauna silvestre, sin embargo, una serie de cambios ambientales, el uso irracional de pesticidas y un enfoque de producción sin conservación, ponen en peligro su supervivencia (Potts et al., 2010).

Además, para Dumitrescu et al., (2022), ante el imparable crecimiento demográfico a nivel mundial se han intensificado las necesidades alimentarias y bajo estas condiciones la apicultura se posesiona como un importante potencializador de alimentos, ya que mediante la polinización se puede obtener un mayor rendimiento agrícola de los cultivos, de igual manera.

El futuro de las abejas ha generado gran preocupación debido a las elevadas pérdidas de colmenas en todo el mundo, entre las principales causas está, una reproducción ineficiente, debido a la calidad espermática, puesto que la reina almacena esperma por varios años, por tal motivo realizar una caracterización del semen de zánganos es objetivo prioritario (Yániz et al., 2013).

De acuerdo a Aizen & Harder., (2009), ante la posibilidad de una crisis productiva por la disminución de polinización, se ha despertado un gran interés tanto político, económico y científico, porque, si bien es cierto se han orientado esfuerzos para mejorar la población de abejas, la demanda actual es mucho mayor debido a la rápida expansión agrícola de cultivos dependientes de polinizadores, por tal motivo, la población de las abejas deben protegerse, no solo para mejorar el equilibrio ambiental sino también para mantener la seguridad alimentaria en todo el mundo.

De acuerdo a Dumitrescu et al., (2022), desde el aspecto económico y social, la apicultura con su servicio biológico representa una fuente adicional de ingresos que benefician especialmente a los pobladores más vulnerables de las zonas rurales que orientan sus actividades al trabajo en campo.

Para INTAGRI., (2019), el cultivo de arándano es obligatorio incorporar de 6 a 10 colmenas por hectárea para su producción, esto debido a la posición invertida que presenta la flor, además, su polen es relativamente pesado y pegajoso, motivo por el cual difícilmente puede transportarse por la acción del viento y requiere de una polinización imprescindible.

A partir de la década de los años 1970, se ha trabajado congelando y descongelando semen de zángano y pese a que, luego de dicho proceso se encontró vitalidad y motilidad espermática, tras la inseminación de reinas, los resultados

demonstraron mayor presencia de zánganos, evidenciando así, la deficiencia de fertilización (Wegener & Bienefeld., 2012).

Según Alcay et al., (2019), la criopreservación es un proceso biotecnológico que paraliza el metabolismo de los espermatozoides, permitiendo almacenarlos por mucho tiempo, sin embargo, dicha técnica, presenta efectos nocivos que afectan directamente la calidad espermática, por ello, actualmente la criopreservación de espermatozoides de zánganos se ha logrado, pero sin alcanzar el nivel deseado.

Por ello, Taylor et al., (2009), manifiesta que, el almacenamiento de espermatozoides durante todo el año, es un punto clave para poder conservar la diversidad de las poblaciones que se encuentran en peligro de extinción y a su vez, difundir rasgos característicos en las colmenas.

El uso de los antioxidantes brinda una significativa importancia para la criopreservación de los espermatozoides con respecto a los efectos dañinos que se van a ver expuestos, el efecto de un antioxidante es proveer electrones a otras moléculas logrando estabilizarlos y evitando así que se produzcan anomalías en los componentes lipídicos, proteicos y nucleicos del espermatozoide (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2020).

La jalea real entre sus componentes, poseen proteínas con gran actividad antioxidante, más específicamente está provista de aminoácidos bioactivos como son cisteína y prolina que proveen una acción favorable para el espermatozoide, manteniendo la integridad de la membrana, brindando un revestimiento frente al estrés oxidativo (Abdelnour et al., 2020).

Para Galarza-Álvarez et al., (2022), la inclusión de jalea real al 0,2 % durante el proceso de criopreservación de espermatozoides bovino permite mejorar el movimiento de los espermatozoides, característica que es importante para asegurar una fecundación eficaz, del mismo modo, Kaleem et al., (2017), indica que la suplementación con jalea real al 1 %, favorece la calidad espermática post descongelación.

Con base a lo mencionado anteriormente, se plantea como objetivo de la presente investigación, evaluar el efecto de la suplementación de jalea real en la criopreservación de espermatozoides de zángano.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el efecto de la suplementación de jalea real en la criopreservación de espermatozoides de zángano.

Objetivos específicos

- Caracterizar la calidad del semen de zángano antes y después de la criopreservación.
- Cuantificar la viabilidad y motilidad de los espermatozoides post congelación.
- Comparar el efecto del uso de la jalea real sobre la calidad espermática pre y post congelación frente a crioprotectores comunes no suplementados.

1 CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Apicultura

La apicultura puede conceptualizarse como el arte de criar y manejar abejas, con la finalidad de producir miel y otros derivados de gran valor biológico y por tanto comercial como son la jalea real, el propóleo, el polen y la apitoxina; actualmente la apicultura está considerada como ciencia y figura como un pilar fundamental de la agricultura, ya que contribuye activamente en la conservación del medio ambiente, potenciando el rendimiento de los cultivos e impulsando el desarrollo económico (Katel et al., 2022). Para Kumar & Yadav., (2021), las prácticas apícolas apropiadas generan ingresos adicionales, por ello, se puede considerar una microempresa que requiere de preparación y equipos a fin de obtener un mayor rendimiento.

1.2 La colmena

Según Wiese & Salomé., (2020), las abejas de la miel son insectos sociales y viven en colonias, con una población equilibrada que en condiciones normales presentan tres castas: 1 abeja reina, de 30.000 a 80.000 abejas obreras y algunos cientos de zánganos, cuyo ciclo de vida se detalla en la figura 1.

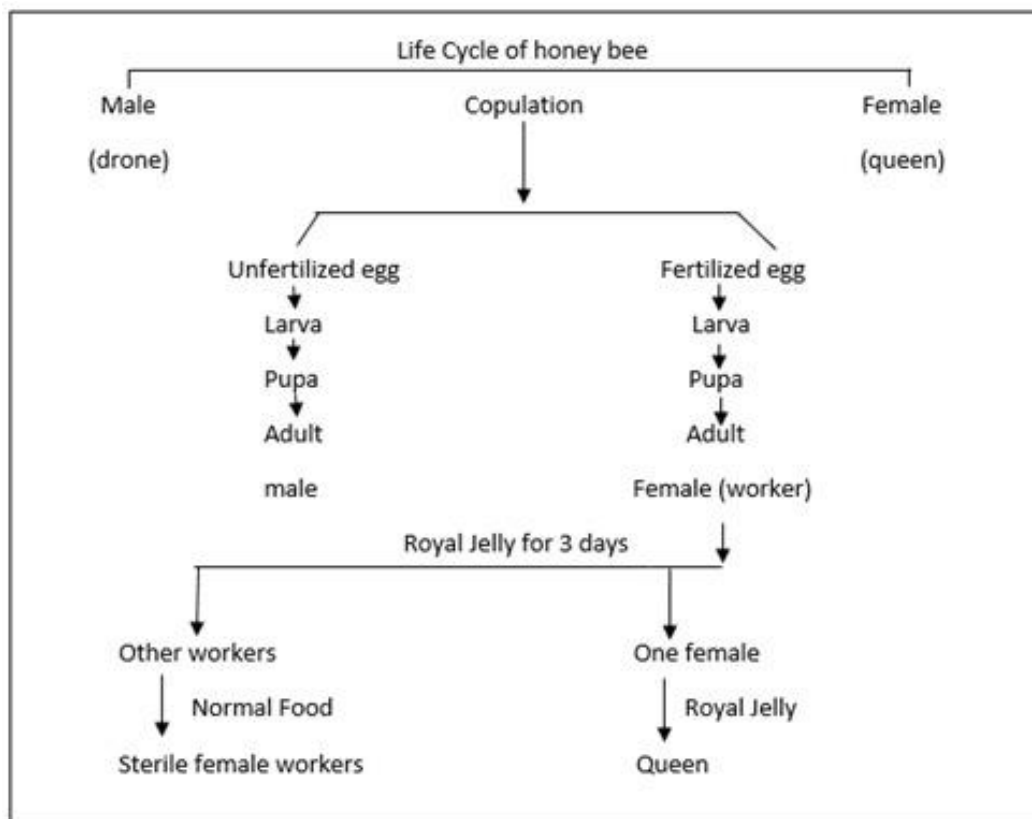


Fig. 1 Ciclo de vida de la abeja *Apis mellifera* L.

Fuente: (Kumar & Yadav., 2021)

1.3 Zángano

La abeja zángano, nace a partir de huevos no fecundados y son considerados los machos de la colmena, cuya función es la de fecundar la reina y aportar calor al nido de la cría (Lara., 2019). El zángano debe tener la capacidad para alcanzar el punto focal, y lograr permanecer bastante tiempo, a su vez, encontrar a la reina durante el vuelo nupcial, combatir con gran cantidad de zánganos para aparearse y entregar el esperma que la abeja reina, va a almacenar en su espermateca (Metz & Tarp., 2019), además, es considerado un insecto monógamo debido a que muere tras desprenderse de sus genitales y dejarlos insertados en los genitales de la hembra (Klowden., 2013).



Fig. 2 Zángano (*Apis mellifera* L.)

Fuente: Laboratorio de entomología de la Universidad Católica de Cuenca

1.4 Anatomía del aparato reproductor del macho

Según Lara., (2019), el sistema reproductor está desarrollado en la reina y los zánganos. Jan Swammerdam fue quien describió por primera vez la anatomía reproductiva del macho de la abeja en 1738, estos órganos reproductores están formados por un par de testículos, túbulos y conductos (vasos eferentes, conductos deferentes y conductos eyaculadores), glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales y glándulas mucosas) y endófalo (Klein et al., 2021).

1.5 Fisiología del aparato reproductor del macho

La anatomofisiología de las estructuras que conforman al aparato reproductor del zángano son:

1.5.1 Testículos

Es un órgano compuesto por dos testículos y numerosos túbulos en los cuales se producen los espermatozoides desde su inicio hasta su completa maduración y traslado hacia la vesícula seminal. La glándula del zángano en sus primeros días de vida se ubica en la parte abdominal, al llegar a los 12 días de vida del zángano los espermatozoides van a dirigirse hacia la vesícula seminal volviéndolos aptos para fecundar a la reina (Kapil., 1962).

1.5.2 Vesícula seminal

De la misma manera, está constituida por dos vesículas, estas tienen una formación de saco largo (fig.3), su principal función es de almacenamiento de espermatozoides maduros que es recibido desde los testículos hasta lograr la cópula (Guth, 1990).

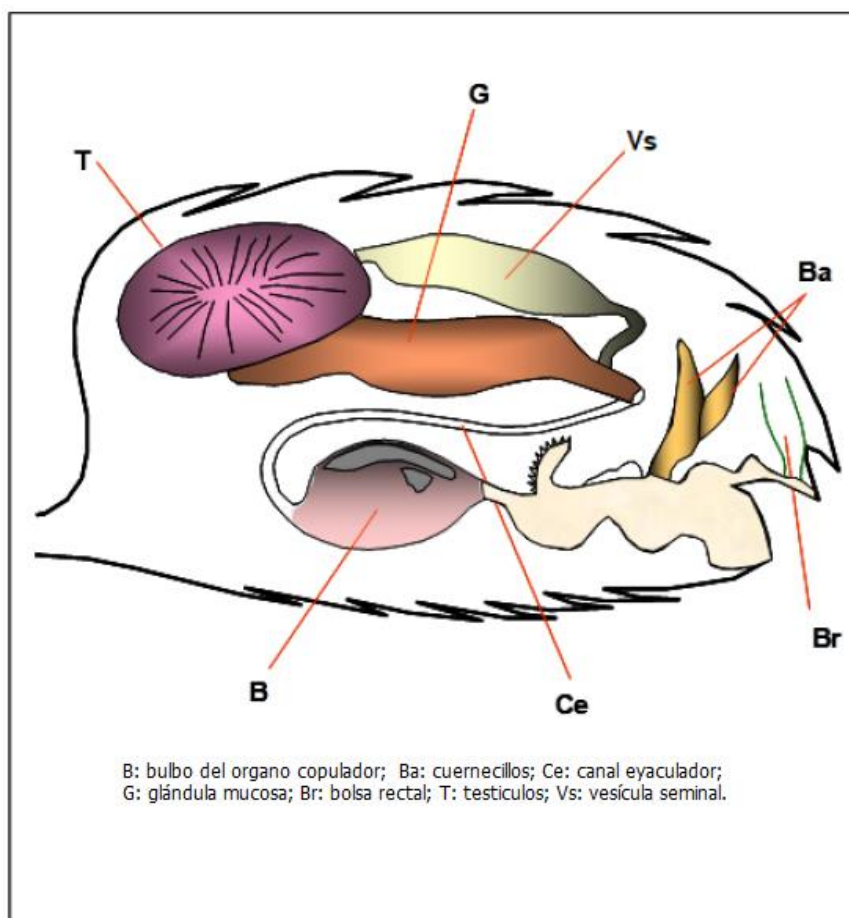


Fig. 3 Anatomía interna de abdomen de un zángano joven.

Fuente: (Guth., 1990).

1.5.3 Glándulas mucosas

Se compone de par de órganos accesorios, al unirse hacia la salida de las vesículas, estas presentan una mucosidad característica por el cual, al instante de la eyaculación ayuda a liberar el semen hacia el exterior por medio del conducto eyaculador hacia la vagina de la reina (Klein et al., 2021).

1.5.4 Canal eyaculador

Su función es de conducción del material seminal desde las glándulas accesorias hasta el orificio terminal del pene o endófalo. Cabe recalcar, en el transcurso de la vida del zángano no hay una unión entre glándulas y lumen del canal, por ende, al momento de la cópula esta conexión se va a romper por el exceso de contracción por lo cual se va a dar la salida por el canal (Bose et al., 2016).

1.5.5 Órgano Copulador

Mejor conocido como endófalo, su forma es tubular alargada, habitualmente está traspuesta dentro de la cavidad abdominal, se forma por placas quitinosas. En el momento de la cópula se produce la eversión del pene y por medio de la presión de la hemolinfa se produce el eyaculado (Barrera., 2004).

1.6 Características del eyaculado

1.6.1 Semen de zángano

El semen de las abejas está conformado por células filiformes que tienen una forma alargada con presencia de puntas cónicas. Las medidas de los espermatozoides oscilan entre 250 y 270 μm de largo y 0,7 μm de ancho y predisponen de una cabeza pequeña y estrecha. El cordón espermático posee un axón de 992 microtúbulos. Las células alargadas se ubican entre el axón y derivado mitocondrial (Yániz et al., 2020).

1.7 Colecta del semen

En abejas, se han descrito dos métodos principales para la recolección de semen basada en cortes de vesículas seminales e inducción de la eyaculación. Sin embargo, en la última década, la eyaculación inducida se ha vuelto el principal método utilizado para recolectar muestras de semen, que consiste en la recolección directa del endófalo (Cobey et al., 2013)

Para el método de extracción por eversión manual, se procede a realizar la estimulación de zánganos con una edad mayor a partir de los 12 días, haciendo una ligera presión con los dedos en la cavidad torácica, por lo cual, se va a inducir a la eversión del endófalo, logrando que el semen quede expuesto y sea extraído de la punta del genital (Abdelkader et al., 2014).

El endófalo posee una forma esférica pequeña, de coloración blanca, para la recolección de la muestra de semen se emplea una jeringa de gran capacidad, tras la aspiración, se puede determinar la cantidad de semen recogido, para potenciar una

mayor tasa en la recolección de semen se obtiene de zánganos adultos, ya que los jóvenes poseen semen en mínimas cantidades, la proporción seminal puede variar significativamente, afectando las condiciones de reproducción (Bratu et al., 2022).

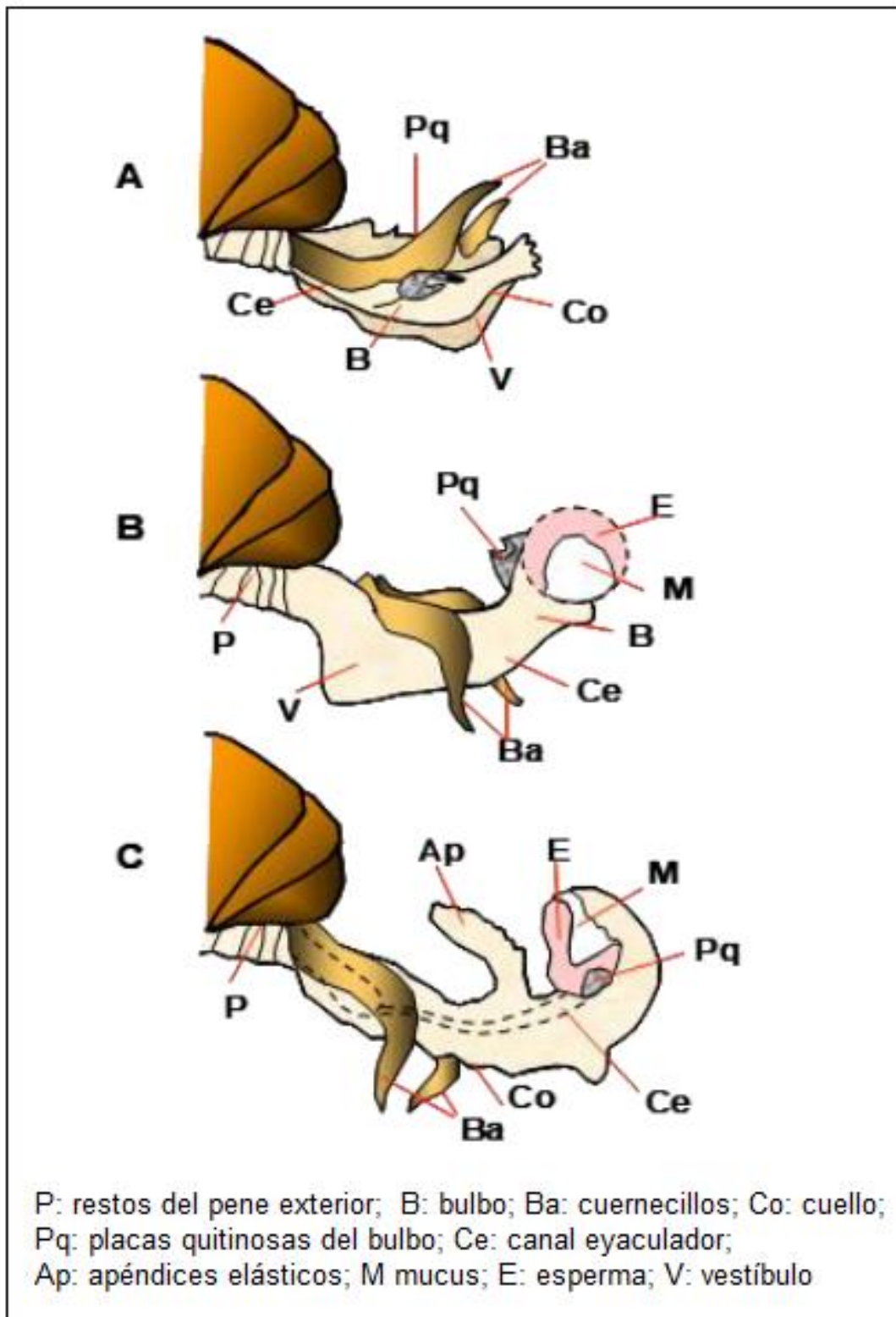


Fig. 4 Eversión del endófalo. A: Inicio de eversión, B: eversión parcial, C: eversión total

Fuente: (Guth., 1990).

1.8 Análisis macroscópico del semen

1.8.1 Volumen eyaculado

Cada zángano puede llegar a producir de 0,5 – 1,3 μL de semen, con un porcentaje de 7,5 millones de espermatozoides, así mismo, la calidad y cantidad del material seminal es de gran importancia para una técnica de inseminación natural o artificial, sin embargo, la viabilidad espermática va a reducir de acuerdo a la edad del zángano (Czekońska et al., 2013).

1.8.2 Color y pH seminal

Para Blum et al., (1962), el semen de zángano presenta un pH de 6,8 - 7,0 y de acuerdo a Kouas & Adjlane., (2020), exhibe un color característico crema casi amarillento, de forma homogénea, generalmente su presentación es compacta, con forma esférica pequeña, claramente se diferencia del mucus blanco (Figura 5a), y a veces disperso, con un aspecto amorfo (Figura 5b), y según Bratu et al., (2022), mientras más contenido de espermatozoides más intenso se presentará el color.

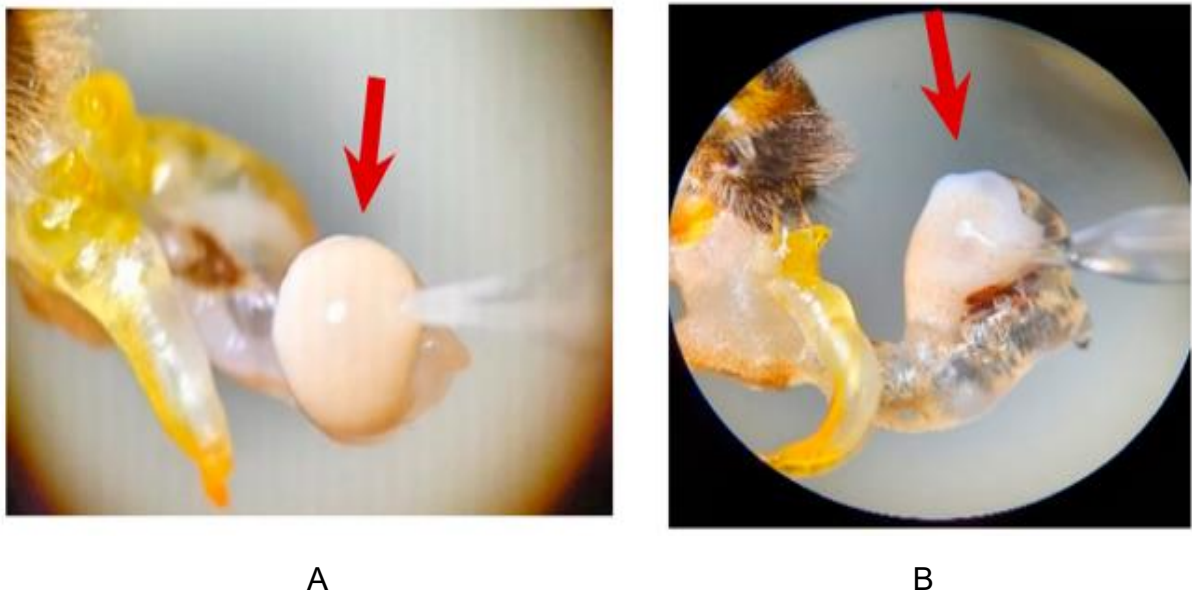


Fig. 5 Presentación del semen (A) eyaculado esférico, (B) eyaculado disperso y amorfo.

Fuente: (Bratu et al., 2022).

1.9 Análisis microscópico del semen

1.9.1 Concentración espermática

Según Schlüns et al., (2003), la concentración espermática del semen, permite determinar la madurez sexual del zángano y se ve influenciada por el tamaño, dado que los ejemplares más pequeños producen una menor cantidad de espermatozoides y oscila entre 2 y 9 millones por μL , sin embargo, dicha concentración es dependiente de otros factores, es así que para Yániz et al., (2020), el peso corporal, la edad, la genética, la estación del año e inclusive algunas enfermedades pueden alterar de manera significativa dicha concentración.

1.9.2 Motilidad espermática

Para Brito et al., (2016), la evaluación de la concentración espermática es considerado un componente esencial en la certificación de la capacidad para la reproducción.

Este parámetro depende en gran medida de las condiciones del ambiente debido a la extrema susceptibilidad del semen por ello es necesario protegerlo para realizar la evaluación de la motilidad de los espermatozoides, misma que se la puede realizar con semen puro o diluido como lo manifiesta Taylor et al., (2009), y Alçay et al., (2015) quienes en su trabajo investigativo emplearon una escala de 0 a 5 para valorar la motilidad de semen fresco, asignando 0 una motilidad menor de 20% y 5 para en el caso que la motilidad que supere el 95%, donde 3 es considerada como ideal.

1.9.3 Viabilidad espermática

La integridad de la membrana plasmática es el parámetro más evaluado, determinante en la valoración de la calidad del esperma, debido a que, al producirse la pérdida de continuidad de esta fina envoltura es considerada incompatible con la viabilidad del espermatozoide (Yániz et al., 2013).

La capacidad fecundante de los espermatozoides requiere de una membrana plasmática funcional e intacta, debido a que es esencial en el proceso de capacitación espermática, reacción acrosómica y unión del espermatozoide a la superficie del óvulo (Ramu & Jeyendran., 2013).

Una membrana plasmática intacta es impermeable al yoduro de propidio (PI), pero esta sustancia puede atravesar membranas dañadas, unirse al ADN y emitir una fluorescencia roja brillante en el núcleo de los espermatozoides muertos, siendo el PI el fluorocromo más utilizado para la tinción de espermatozoides muertos (Yániz et al., 2020).

1.9.4 Morfología del espermatozoide

Morfológicamente el espermatozoide de zángano cuenta con una estructura particular, ya que, su cabeza es muy pequeña, cuyo núcleo es cilíndrico y alargado, diferenciándose de otras especies, al cuello se lo describe como una estrecha banda citoplasmática, mientras que la cola, es la que proporciona el movimiento, contiene 9 fibrillas y representa hasta un 90% de la longitud total del espermatozoide (Egea De Prado et al., 1990).

El proceso de criopreservación involucran factores que pueden ocasionar alteraciones morfológicas en los espermatozoides provocando una reducción significativa de la motilidad espermática, restringiendo así su funcionalidad y comprometiendo su fertilidad (Gulov & Bragina., 2022).

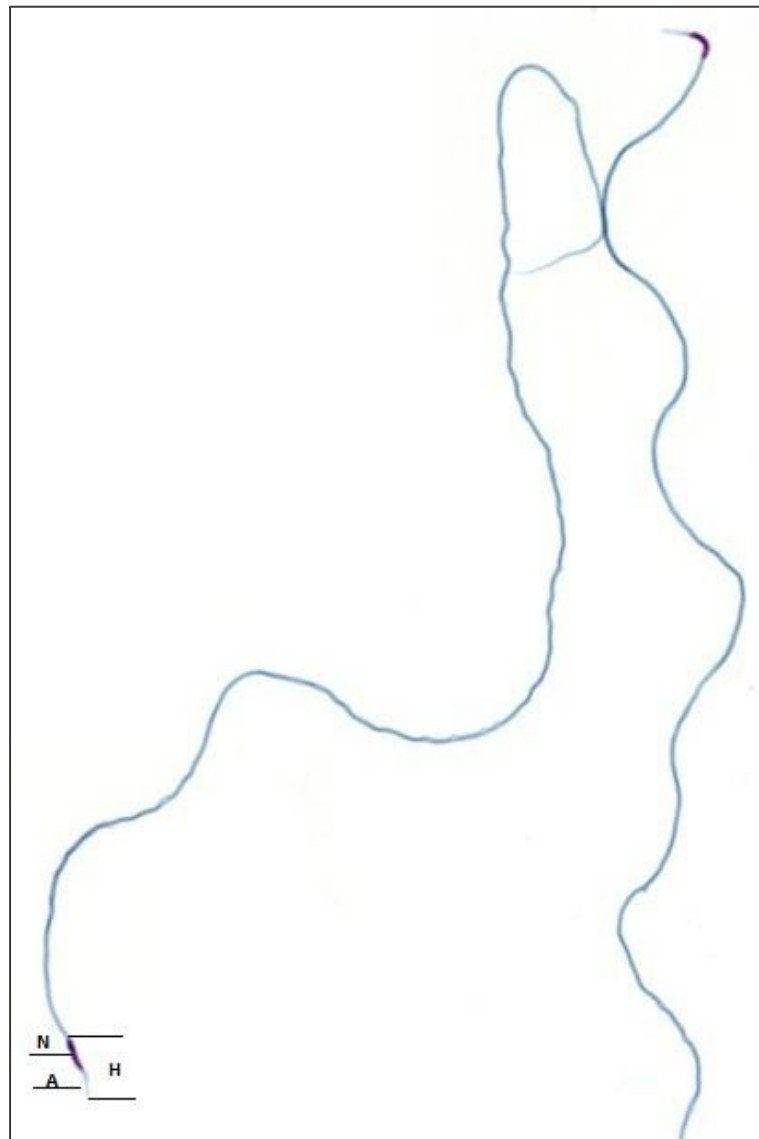


Fig. 6 Estructura del espermatozoide, H: cabeza; N: núcleo; A: región acrosomal.

Fuente: (Gontarz et al., 2016)

1.10 Técnicas para la evaluación de la vitalidad espermática

1.10.1 Eosina - Nigrosina

Es una técnica de tinción que permite evaluar la vitalidad del espermatozoide permitiendo diferenciar entre vivos y muertos ya que, una característica principal del espermatozoide muerto es la presencia de agujeros y perforaciones de la membrana volviéndolas permeables frente al colorante (Björndahl et al., 2003).

Mientras la nigrosina tiene como función aumentar el contraste entre el fondo y las cabezas de los espermatozoides logrando facilitar su visualización, mientras que la eosina accede únicamente en los espermatozoides muertos tiñéndolos de un rojo oscuro, entre tanto que los espermatozoides vivos se exhiben blancos (Agarwal et al., 2016).

1.10.2 Test hipoosmótico (HOST)

De acuerdo a Nur et al., (2011), una estrategia alternativa es el uso de soluciones hipoosmóticas (prueba de hinchazón hipoosmótica, HOST), que también puede proporcionar información valiosa sobre el estado de la membrana plasmática, dicha técnica se basa en la evaluación del enrollamiento de la cola asociado a la acumulación de agua en espermatozoides con membranas plasmáticas intactas.

Según detalla Ramu & Jeyendran., (2013), el test se realiza usando una dilución de semen en relación de 1:10 de solución hipoosmótica, incubándose por 30 minutos aproximadamente a 37°C, para posteriormente ser observadas en el microscopio.

1.10.3 Yoduro de propidio

Es una molécula fluorescente que se une al ADN, pero no logra atravesar células que contienen una membrana plasmática intacta. Esta técnica se utiliza para diferenciar y cuantificar células muertas en donde las membranas se vuelven permeables (Crowley et al., 2016).

1.10.4 Hoechst

Es un fluorocromo que se une selectivamente al ADN del núcleo del espermatozoide, ingresa tanto en membranas celulares dañadas e intactas, permitiendo que el núcleo se torne azul brillante fluorescente, brindando la facilidad de conteo en un campo microscópico (Locke et al., 1990). Esta colorante fluorescente ha sido muy empleado en el análisis de la viabilidad de los espermatozoides formando una tinción dual con Ioduro de propidio, dicha técnica ha sido empleada por Gulov & Bragina., (2022) y Paillard et al., (2017) para analizar espermatozoides de zánganos fresco y post congelado.

1.11 Métodos de conservación de espermatozoides

1.11.1 Principios de la criopreservación

La criopreservación es considerado el método más conveniente al momento de conservar células tratar por un largo tiempo, sin embargo, esta técnica depende de un adecuado proceso de congelación, almacenamiento y descongelación, a fin de minimizar el daño celular (Parihar et al., 2023)

1.11.2 Semen fresco

El semen fresco de zángano consigue almacenarse a temperaturas sobre el punto de congelación por varias semanas y sin perder la viabilidad espermática, este material genético puede ser almacenado entre 13°C y 25°C, por ende, se ha visto una mayor viabilidad del 70-80% cuando se mantiene a 12°C y 16°C por seis semanas (Paillard et al., 2017), sin embargo para Alçay et al. (2015), la vida útil del semen fresco expuesto a temperatura ambiente es reducida a un lapso máximo de dos semanas.

1.11.3 Semen congelado

El congelamiento de semen en *Apis Mellifera* L, es considerado como herramienta que se puede aplicar en la apicultura actual, ya que, estudios realizados por Collins (2004), debaten que, si se consigue mejorar la supervivencia espermática durante la conservación, el semen almacenado aportaría como instrumento valioso para el apicultor, pues actualmente se menciona que la viabilidad del semen sometido a dilución y congelamiento alcanza el 42.6%.

Por su parte Taylor et al., (2009), experimentaron con técnicas comúnmente empleadas en la crioconservación seminal de especies mamíferas, consiguiendo mejorar la viabilidad hasta un 68% post descongelación del semen de zángano (*Apis mellifera* L). Altos valores de viabilidad proporcionan una buena perspectiva para la futura optimización en técnicas de criopreservación, mejorando el almacenamiento genético favoreciendo el progreso de genotipos de abejas melíferas (De Araujo Freitas & Quezada Euan., 2011).

Si bien es cierto, para Özkavukçu., (2002), el objetivo primordial de la criopreservación es mantener la viabilidad y funcionalidad celular a bajas temperaturas, existen problemas inherentes asociados a las propiedades químicas, térmicas y eléctricas, que afectan directamente la estructura celular y, por ende, limitan su éxito ya que este método presenta períodos críticos para la sobrevivencia celular.

Durante el proceso de criopreservación las membranas celulares son las estructuras que reciben el mayor daño, si bien es cierto, los productos crio preservados se deben almacenar a temperaturas desde -133°C (vapores de nitrógeno

líquido) a -196°C (nitrógeno líquido), las dificultades de la congelación no derivan de la permanencia a bajas temperaturas, sino de las técnicas de congelación y descongelación (Ávila-Portillo et al., 2006).

1.11.4 Agentes crioprotectores (ACP)

Para Ávila-Portillo et al., (2006), los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución, el descenso del punto eutéctico involucra que se alcanzará una concentración de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor, por tanto, bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crioprotectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol y glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa) y el dimetil sulfóxido (DMS), así también, los crioprotectores pueden clasificarse también en agentes penetrantes y no penetrantes de acuerdo a la permeabilidad celular.

1.11.5 Diluyentes

La composición de los diluyentes de semen de crioconservación mejorados desempeña un papel clave en el mantenimiento o la mejora de la calidad, actualmente se han evaluado inmensidad de componentes que se adicionan al diluyente de congelación, entre ellos: la leche, glicocola, glicerina, yema de huevo, agua de coco y lecitina de soya, cuya finalidad es, preservar las características funcionales de las células espermáticas, y conservar el índice de fertilidad apropiado y resguardar de las lesiones inducidas por el choque térmico (Dadkhah et al., 2016).

1.12 Jalea real

La jalea real es una sustancia secretada por las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas obreras, su apariencia es blanquecina y viscosa, su consumo es exclusivo de la abeja reina durante todo su ciclo de vida. La jalea real es considerada un coloide ácido, cuyo pH varía entre 3,6 y 4,2, entre los principales compuestos encontramos en mayor porcentaje 50-70% de agua, 9-18% proteínas, 7-18% de carbohidratos, 3-8% de ácidos grasos y lípidos, 1,5% de minerales (Dumitru et al., 2022).

1.12.1 Propiedades antioxidantes de la jalea real.

Las principales proteínas de la jalea real poseen una gran actividad antioxidante, mediante el cual, se ve reflejado el aporte de la separación de los radicales libres, además, la estructura de la jalea real, está provista netamente de aminoácidos bioactivos especialmente cisteína y prolina también contiene ciertos minerales como: Ca, K, Mg, Na; así mismo, de vitaminas: C y E; provee una acción favorable a la mantención de la integridad de la membrana brindando un blindaje frente al estrés oxidativo (Abdelnour et al., 2020).

Para Coskun et al., (2020), la jalea real posee propiedades biológicas tales como antioxidante, antibacteriana, antialérgica, antitumoral, antiinflamatoria, antihipertensiva y antienvjecimiento aplicadas principalmente en animales de experimentación.

2 CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio fue experimental positivista, cuyo diseño investigativo constó de dos etapas: de campo y de laboratorio; y en donde se empleó jalea real como coadyuvante en concentración al 1%, para así evaluar su efectividad antioxidante, durante el proceso de criopreservación de semen de zángano, y de esta forma mejorar la calidad espermática.

2.2 Materiales

2.2.1 Materiales de campo

- Botas
- Traje apicultor
- Ahumador
- Fósforo
- Cámara fotográfica
- Palanca para manejo de cuadros
- Cepillo para desabejar
- Caja transportar zánganos

2.2.2 Materiales de Laboratorio

2.2.2.1 Biológicos

- Semen de zángano
- Jalea real de abejas

2.2.2.2 Físicos

- Guantes de examinación
- Mascarillas
- Cooler
- Rampa de criopreservación
- Jeringas
- Mechero de alcohol
- Capilares de vidrio
- Catéter de mariposa
- Pipetas
- Puntas de pipetas
- Microscopio
- Estereoscopio
- Microscopio de fluorescencia
- Refrigeradora
- Cámara de neubauer

- Cubreobjetos
- Portaobjetos
- Termo agua
- Baño María
- Pinzas
- Tijera
- Platina térmica
- Tanque criogénico
- Nitrógeno líquido
- Suero fisiológico
- Tubos eppendorf
- Pajuelas de 0,25
- Sellador pajuelas

2.2.3 Materiales químicos

- Diluyente DMSO
- Yema de huevo
- Tinción Eosina Nigrosina
- Test de HOST
- Yoduro de propidio
- Hoechst

2.3 Variables

2.3.1 Variables independientes

- 1% Jalea real

2.3.2 Variable de inclusión

- Volumen

2.3.3 Variables intervinientes

- Época del año (invierno, abril – mayo)

2.3.4 Variable Dependiente

- Morfología espermática
- Motilidad (escala 1-5)
- Vitalidad (%)
- Integridad de la membrana (%)

2.4 Área de estudio

La presente investigación se realizó en el apiario del señor Hipólito Alberca que se encuentra ubicado en la parroquia de Sinincay, perteneciente al cantón Cuenca de la provincia del Azuay a 6 km del casco urbano, a una altura de 2685 m s.n.m., con presencia de dos pisos climáticos frío andino y templado interandino, el mismo que predomina en las zonas pobladas, con una temperatura media anual que varía en base a las áreas con las zonas más bajas alcanzando un rango de 14°C a 16°C y posee una pluviosidad promedio de 950 a 1000 milímetros (PDOT GAD Sinincay., 2020).

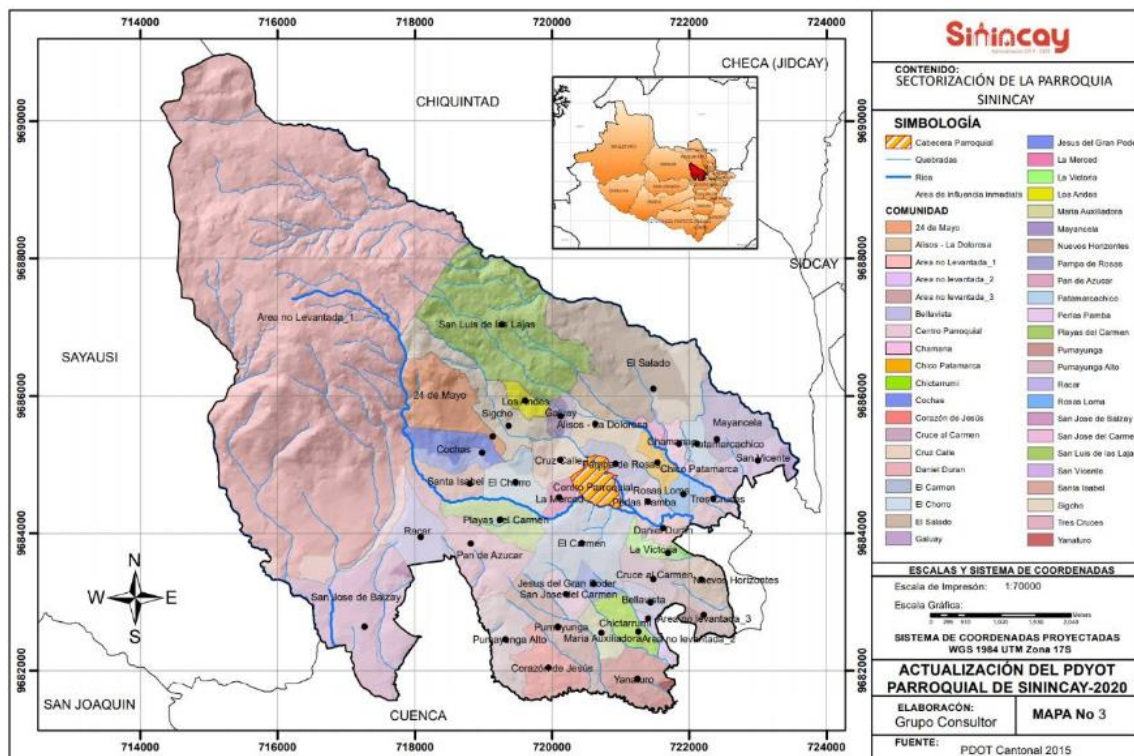


Fig. 7 Mapa geográfico de la parroquia Sinincay

Fuente: PDOT GAD Sinincay., (2020)

2.5 Diseño del Experimento

El diseño de esta investigación estuvo orientado a determinar los beneficios de la inclusión de jalea real como crioprotector en la congelación de semen de zángano para lo cual, se empleó diluyentes suplementados con 1% jalea y un diluyente comercial a base de TCG (tris, ácido cítrico, glucosa) más yema de huevo y DMSO, para la evaluación de la calidad seminal post descongelación.

Se empleó un diseño completamente al azar basándose en los dos tratamientos antes mencionados, con 4 repeticiones y la unidad experimental fueron 10 pajuelas de 0,25cc tanto para control como jalea.

2.6 Universo de estudio

Se procedió a trabajar con zánganos durante un periodo de dos meses (abril y mayo) del año 2023, para lo cual se emplearon 396 ejemplares machos pertenecientes a la especie *Apis mellifera* L.

2.7 Procedimiento

Procedimiento de campo

Etapa 1.

Se inició identificando el conjunto de colmenas que conforma el apiario en compañía de su propietario, se determinó que la raza a trabajar corresponde a la especie *Apis* del género *mellifera* L, y la forma adecuada de manejo de cada colmena, manteniendo el bienestar animal (H. Alberca, comunicación personal, 24 de abril de 2023).

Etapa 2.

La captura de zánganos se realizó dos días por semana, a partir de las 10 de la mañana, evitando las primeras horas de la mañana a fin de mantener abrigada la colmena como lo recomienda Agrocalidad., (2015). El proceso de captura y transporte se lo realizó por 8 veces.

Las muestras fueron tomadas al azar sin considerar tamaño o edad y directamente del interior de diferentes colmenas para ser transportados en una caja previamente diseñada, cuyas medidas eran 30 cm de largo por 15 cm ancho y 15 cm de fondo, debidamente adecuada para conservar la temperatura, que permitió garantizar la supervivencia durante el traslado al laboratorio que tardaba de 30 minutos aproximadamente.

2.8 Procedimiento de laboratorio

Etapa 1. Proceso de eversión del endófalo.

Se colocó al zángano entre los dedos pulgar e índice, de la mano menos diestra colocándolo en posición invertida, con ayuda de la otra mano se aplicó presión sobre la cabeza con lo cual se lograba la eversión parcial del endófalo y se apreciaba un endurecimiento involuntario y sin dejar de presionar el abdomen se deslizaban los dedos hacia abajo suavemente provocando la eversión completa.

Posteriormente se recogió la muestra seminal directamente del endófalo, durante todo este proceso se mantuvo las condiciones sanitarias apropiadas como lo detalla Cobey et al., (2013).

Cabe recalcar que, para la extracción y colecta del semen se debe realizar en un tiempo no mayor a dos horas post captura, ya que se evidenció una notable pérdida de zánganos, comprometiendo la extracción seminal.

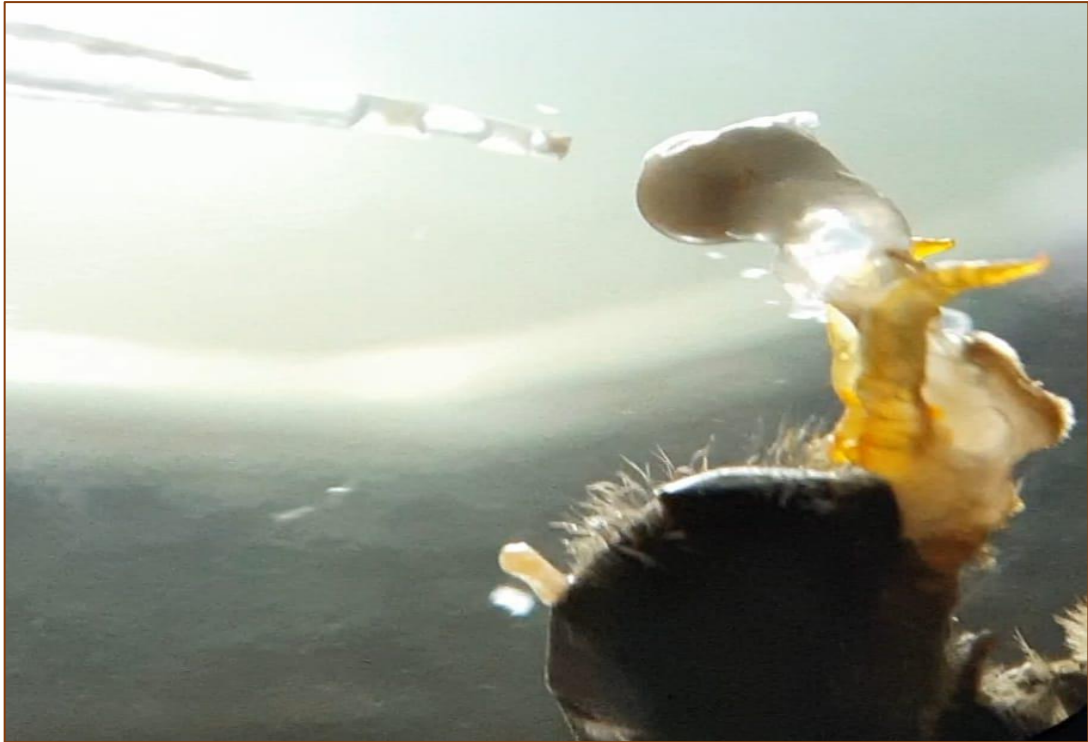


Fig. 8 Eversión total del endóforo

Etapa 2. Recolección semen

Para la recolección del material seminal se utilizó un capilar de vidrio con capacidad de $100 \mu\text{l}$, extendido con la ayuda de un mechero de alcohol el cual estuvo conectado a una jeringa colectora de 5 ml por medio de un catéter mariposa modificado (figura 9), el procedimiento se realizó con la ayuda de un estereoscopio Nikon SMZ800N (Japón), lo que facilitó diferenciar la porción de muestra seminal del mucus logrando realizar una correcta extracción.



Fig. 9 Equipo casero adaptado para la colecta de semen

Cabe recalcar que al momento de la colecta se debe evitar aspirar mucus, ya que, esto dificulta el proceso y sella el equipo, provocando una obstrucción del capilar evitando la aspiración de la muestra.



Fig. 10 Diferenciación entre semen (b) y mucus (a)



Fig. 11 Colecta del semen observado a través del estereoscopio.

Etapa 3. Extracción de las muestras.

Una vez extraída la muestra, se procedió a colocar en tubos Eppendorf de 1,5 ml, previo al inicio de la extracción, se llevó a cabo un registro de la colecta de semen, obteniendo los datos de los individuos que proporcionaron una muestra válida, con la información recopilada se procedió a determinar la eficiencia de la colecta.

Durante el transcurso de la colecta se evidenció que no todos los zánganos capturados eyacularon, como lo manifiesta Stefan., (2013), por tal motivo fue necesario disponer de un mayor número de población, para favorecer dicho proceso.

Etapa 4. Determinación de la concentración espermática.

Para este proceso fue necesario realizar una dilución, debido a que el volumen era proporcionalmente pequeño y a su vez se encontraba con una elevada concentración de espermática.

Para lo cual se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides}/\mu\text{l} = \bar{x} \left(\frac{1 \text{ cuadrado}}{0.1 \text{ mm}^3} \right) \left(\frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ ml}} \right) \left(\frac{1 \text{ ml}}{1000 \mu\text{l}} \right) (FA) (50)$$

Donde:

\bar{X} = Promedio de espermatozoides.

FA = Factor de dilución, en este caso 1/2000.

Etapa 5. Caracterización del semen fresco.

En esta fase se analizó la motilidad masal de una muestra sin dilución, la cual fue obtenida de un zángano, la forma de evaluación fue subjetiva, basados en una escala de 0 a 5 como lo detalla Ávalos Rodríguez et al., (2018).

Posteriormente se preparó una dilución en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. donde se colocó 10 μL de semen diluido y 50 μL de test de HOST, la muestra se homogeneizó de manera suave durante un minuto, seguidamente se dejó incubar a 35°C en la platina termostática por un tiempo de 40 minutos, cumplido el tiempo se elaboró un frotis con lo que se evaluó la integridad de la membrana de los espermatozoides.

Así mismo, se realizó una preparación en un tubo Eppendorf, donde, se colocó 10 μL de semen diluido y 10 μL de la tinción de Eosina-Nigrosina y se procedió a homogeneizar por un minuto, con lo cual se realizó un frotis para determinar la morfología espermática.

Los frotis fueron evaluados independientemente bajo un microscopio con lente de 40X, y se registraron los datos obtenidos.

Etapa 6. Crio preservación del semen.

Para realizar el proceso de criopreservación se preparó los dos grupos experimentales en tubos Eppendorf, 1 control (diluyente – crioprotector – y muestra seminal), 2 jalea (diluyente – crioprotector – muestra seminal y jalea real en concentración del 1%), los contenidos de los tubos Eppendorf se colocaron en pajillas de 0,25 cc, posteriormente se sellaba con polvo en su extremo.

Como primer paso para el proceso de congelación, se procedió a colocar las pajillas en una rampa de criopreservación y posteriormente se disminuyó la temperatura, partiendo de 19°C (ambiente) hasta 5°C colocando en una nevera por un lapso de tiempo de 2 horas, transcurrido ese tiempo, se introdujo la rampa incluidas las pajillas en un cooler para someterlas a vapores de nitrógeno por un tiempo de 12 minutos y finalmente se sumergieron las pajillas en nitrógeno líquido hasta alcanzar temperaturas de -196°C, quedando almacenadas en un termo de criopreservación (Figura 12).

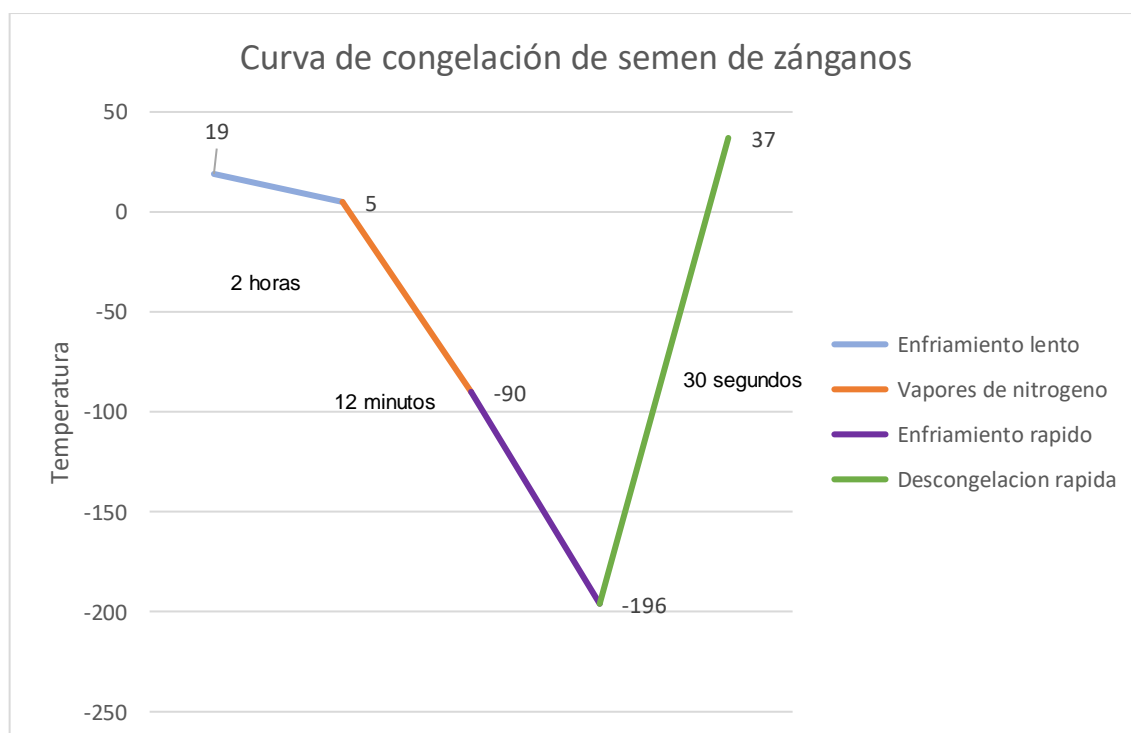


Fig. 12 Curva de congelación de semen de zángano

Fuente: Elaboración propia

Etapa 7. Proceso de descongelación.

La descongelación se realizó de manera individual, sumergiendo cada pajilla en un termo de agua a temperatura de 37°C en un lapso de tiempo de 30 segundos, luego de ello, se retiró y secó, seguidamente se cortaron los dos extremos de la pajilla y se depositó su contenido en un tubo Eppendorf debidamente rotulado.

Para el análisis se utilizó un microscopio ZEISS Primostar 3 (China), con lente de 40x de aumento, que era conectado a una pantalla de procesador para lograr agilizar las visualizaciones de las muestras, una vez realizado este proceso, se preparó las muestras para ser analizadas y evaluadas, en base a parámetros de motilidad, viabilidad, morfología e integridad de la membrana.

Etapa 8. Motilidad post descongelamiento

Para la evaluación de este parámetro se depositó 5 μL de muestra descongelada de jalea y de control, sobre un portaobjetos, luego se colocó un cubreobjetos para su respectivo análisis, para este proceso se tomó en consideración una escala del 1 al 5, donde el valor inferior era considerado sin movimiento y el mayor fue considerado movimiento óptimo.

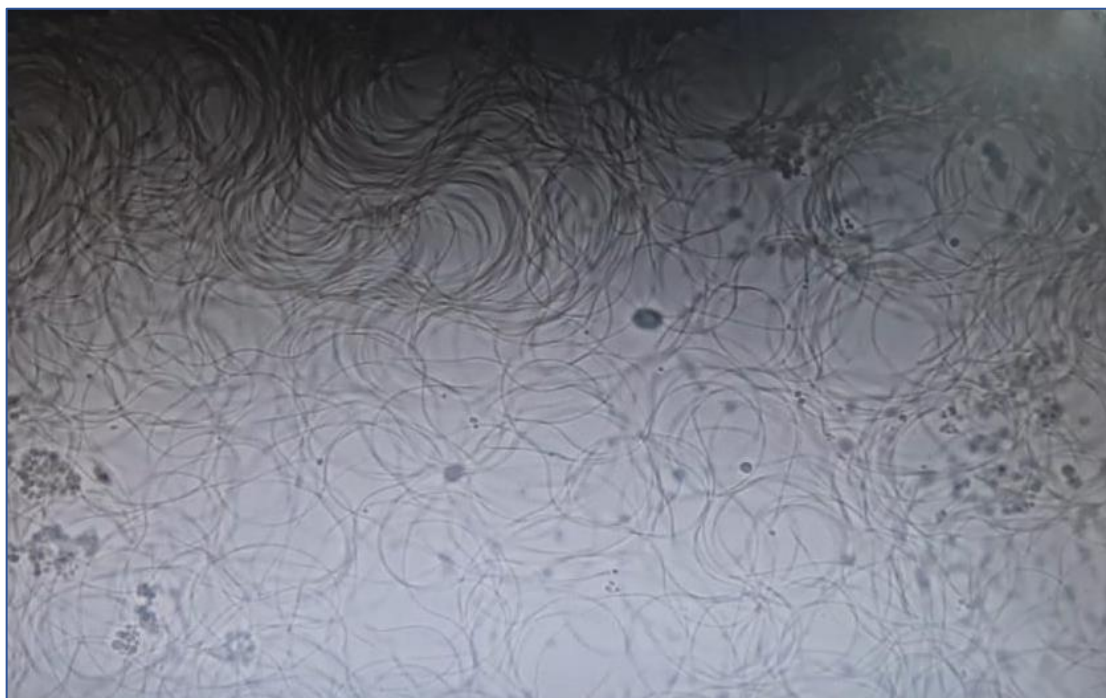


Fig. 13 Placa de motilidad masal vista al microscopio con lente de 40x.

Etapa 9. Integridad de la membrana post descongelamiento

Para el análisis de esta prueba empleamos una preparación que consistió en colocar 10 μL de la muestra post descongelada y 50 μL del test de HOST en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se homogeneizó la muestra y se procedió a dejar incubar a 35°C en una platina termorreguladora por un tiempo de mínimo de 40 minutos, para el análisis se colocó parte de la muestra en un portaobjetos y se realizó un frotis para observarlo al microscopio Olympus BX51(Japón), empleando un lente de 40x, este proceso se realizó para los dos grupos experimentales (jalea y control).



Fig. 14 Placa de frotis con test de HOST vista al microscopio lente de 40x.

Etapa 10. Morfología post descongelamiento

Para valorar la variable de morfología espermática se preparó una muestra de 10 μL y manejamos la tinción de Eosina-nigrosina en una medida de 10 μL , colocándolos en un tubo Eppendorf, se homogeneizó y se dejó reposar por un tiempo de 5 minutos. Una vez concluido este tiempo se colocó una muestra sobre un portaobjetos realizando un frotis, posteriormente se analizó en el microscopio, se realizó con los dos grupos experimentales.

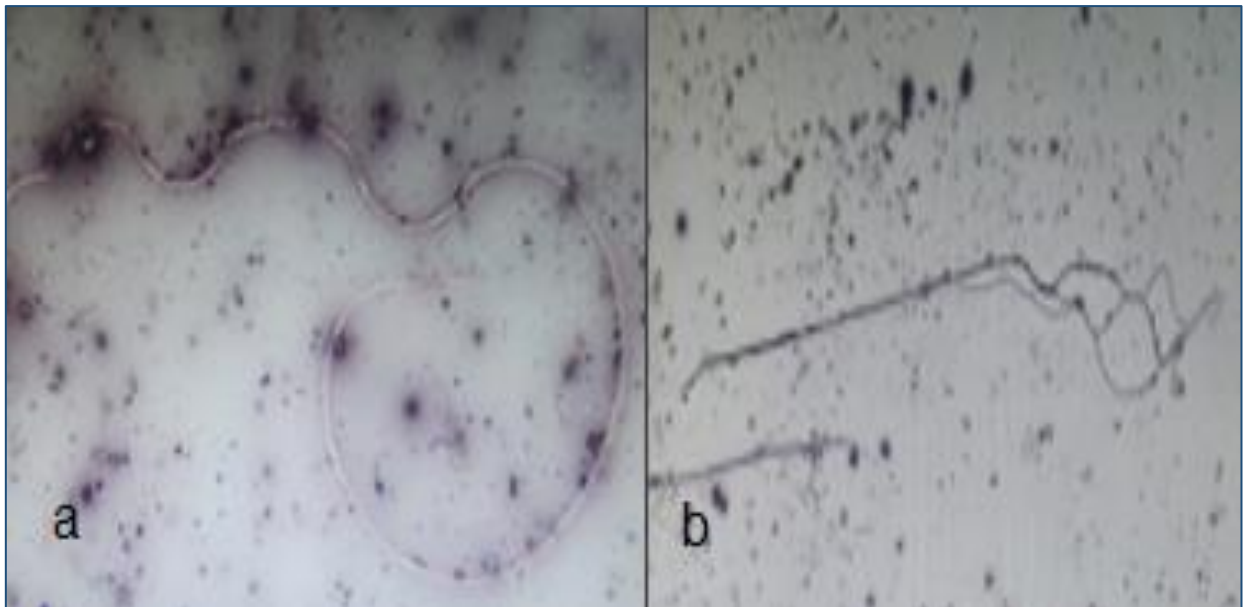


Fig.15 Frotis de espermatozoides con tinción de eosina-nigrosina vista al microscopio lente de 40x.
a) espermatozoide sin alteracion morfológica (normal), b) espermatozoide con alteracion (cola doble o fragmentada).

Etapa 11. Viabilidad espermática post descongelamiento.

La diferenciación de espermatozoides vivos y muertos se evaluó utilizando el protocolo de tinción fluorescente dual, el cual consistió en preparar la muestra en un tubo Eppendorf, colocando 25 μL de muestra seminal y agregando 1 μL de Yoduro de propidio dejando que actúe por 3 minutos, para luego adicionar 5 μL de tinción Hoechst, para el análisis se realizó un frotis con la preparación, tanto para jalea como para control y después se observó utilizando un microscopio fluorescente.

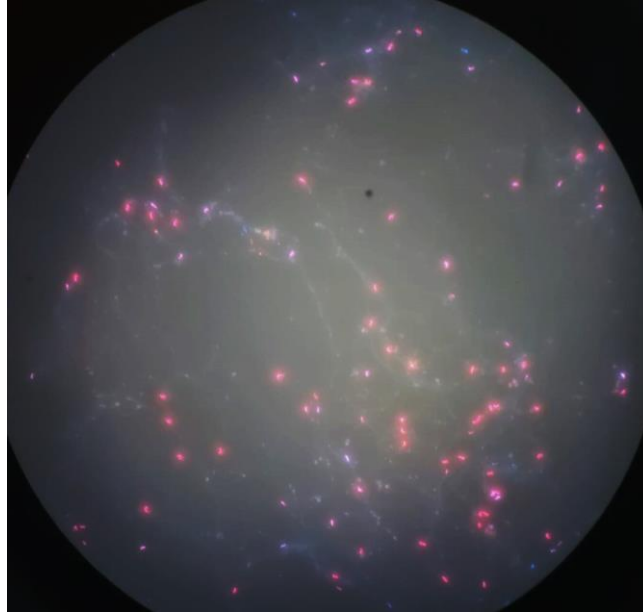


Fig. 16 Placa con tinción dual Yoduro de Propidio y Hoechst vista al microscopio fluorescente.

2.9 Análisis Estadístico

Para el análisis de las variables dependientes del semen pre congelado se utilizó la prueba de análisis de varianza con el programa estadístico INFOSTAT, donde se correlacionaron los datos correspondientes a cada repetición.

Para el análisis del semen post descongelamiento de los datos obtenidos se sometieron a la prueba ADEVA ($p \leq 0,05$) del programa estadístico INFOSTAT, mientras que para la valoración del vigor se empleó la prueba Kruskal Wallis ($p \leq 0,05$) debido a que los valores no son paramétricos.

2.10 Cuadros Estadísticos

Cuadro 1. Morfología espermática (Eosina-Nigrosina)

Tratamiento	n	Media (%)
Control	16	87,56 ± 3,79
Jalea	16	90,69 ± 2,52
Valor T		-2,74
Valor p		0,010

El Cuadro 1 evidencia la comparación de la Eosina – Nigrosina, respecto a la morfología normal y anormal, donde la suplementación de jalea 90,69 ± 2,52% genera un porcentaje mayor frente al control 87,56 ± 3,79% con un valor de significancia de ($p < 0,010$).

Cuadro 2. HOST (Permeabilidad de la membrana)

Tratamiento	n	Media (%)
Control	16	88,31 ± 3,93
Jalea	16	90,25 ± 3,57
Valor T		-1,46
Valor p		0,154

El cuadro 2 indica los resultados obtenidos del test de HOST referente a la permeabilidad de la membrana donde no existe una diferencia significativa entre los dos tratamientos ($p = 0,154$).

Cuadro 3. Evaluación Viabilidad espermática (Yoduro Propidio/Hoechst)

Tratamiento	n	Media (%)
Control	16	40,88 ± 10,08
Jalea	16	37,13 ± 11,96
Valor T		0,96
Valor p		0,345

El cuadro 3 registra el porcentaje de espermatozoides muertos obtenidos mediante tinción fluorescente (Yoduro de Propidio), donde no existe diferencia significativa ($p = 0,345$) entre control y jalea.

Cuadro 4. Evaluación de la Motilidad individual

Tratamiento	n	Media (%)
Control	16	46,56 ± 16,80
Jalea	16	40,63 ± 23,23
Valor T		0,83
Valor p		0,414

El cuadro 4 detalla la evaluación de la motilidad espermática post descongelación donde los resultados tanto para control y jalea no son significativos ($p=0,414$).

Cuadro 5. Evaluación del Vigor

Tratamiento	n	Media (1-5)	Mediana
Control	16	2,47 ± 0,69	3
Jalea	16	2,44 ± 1,03	2
Valor H		2,75	
Valor p		0,082	

El cuadro 5 representa los resultados obtenidos del vigor espermático post descongelación entre control y jalea, por lo que el análisis demostró que no se evidencia diferencia significativa ($p=0,082$).

CAPITULO 3

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

Cuadro 6. Eficiencia de la colecta

	Zánganos capturados	Zánganos que eyacularon	%	volumen total (µL)	µL/zángano
	122	55	24,8	41,25	0,75
	76	28	26,4	14	0,5
	91	26	18,4	39	1,5
	107	43	20,8	21,5	0,5
Total	396	152		115,75	
Promedio	99,0	38,0	38,4	28,9	0,8
D.E	19,9	13,6	3,6	13,3	0,5

El cuadro 6, indica el número total de zánganos manipulados en la investigación (396), para la extracción de semen de los cuales se obtuvo una muestra válida de 152 especímenes, alcanzando un rendimiento de 115,75 µL de volumen total con un promedio de 38,4 ± 3,6% cuyo promedio individual de eyaculado por zángano de 0,8 ± 0,5 µL.

Cuadro 7. Resumen Estadístico

	Pre congelación	Control	Jalea	Valor p
Motilidad Masal (1-5)	2,88 ± 0,25			
Concentración (X10 ⁶ /µL)	2,8 ± 0,43			
Integridad de la membrana %	90,00 ± 1,41			
Morfología normal %	93,00 ± 2,45 ^a			
Vigor (1-5)		2,97 ± 0,69	2,44 ± 1,03	0,097
Funcionalidad de la membrana post congelación %		40,88 ± 10,08	37,13 ± 11,96	0,345
Motilidad Individual %		46,56 ± 16,80	40,63 ± 23,23	0,414
Morfología post congelación %		87,56 ± 3,79 ^{ab}	90,69 ± 2,52 ^b	0,010
Integridad de la membrana post congelación %		88,31 ± 3,93	90,25 ± 3,57	0,154

El cuadro 7 expresa una recopilación de todos los datos conseguidos a partir del análisis de las variables, donde únicamente se evidenció una diferencia significativa en la morfología del control 87,56 ± 3,79 frente a Jalea 90,69 ± 2,52 con un valor p<0,010, frente a un valor de la pre congelación inicial 93,00 ± 2,45.

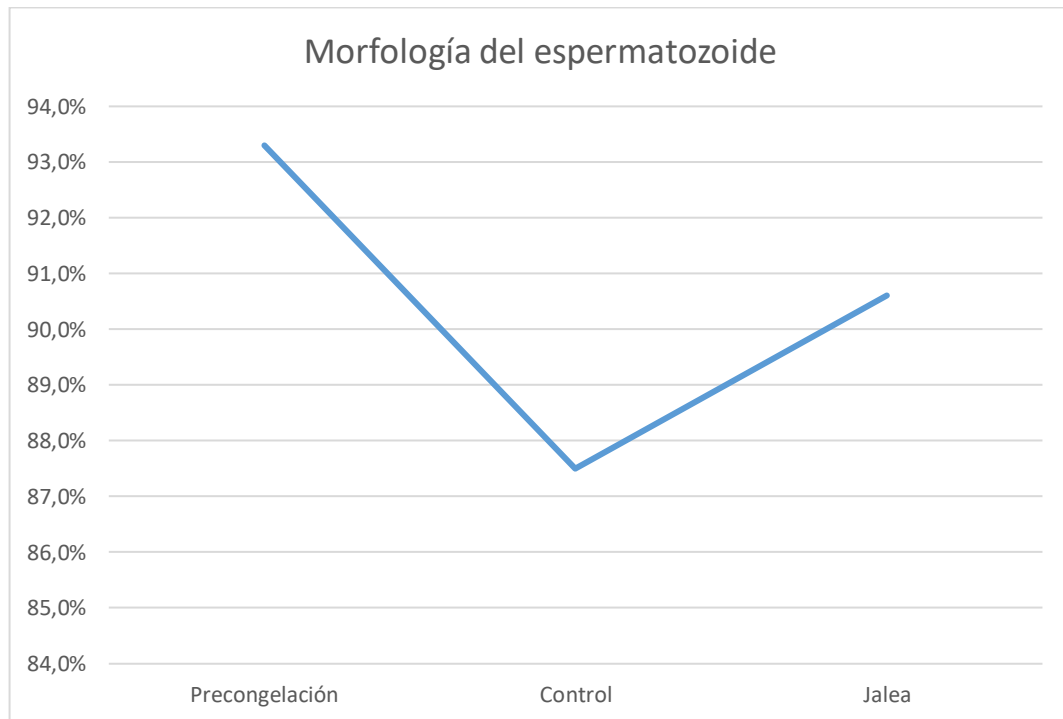


Fig. 17 La morfología normal de los espermatozoides empieza con un valor 93,03% en pre congelación, disminuyendo en el control con un valor de 87,5%, mientras que, con jalea se evidencia un notable descenso de anomalías con un valor de 90,6% de morfología normal.

3.2 DISCUSIÓN

La valoración morfológica posterior al análisis de la tinción de eosina nigrosina aplicada a los espermatozoides, evidenció anomalías morfológicas tales como: colas fragmentadas, divididas y enrolladas, datos que coinciden con Bratu et al., (2022), quienes manifiestan los mismos hallazgos y con las principales anomalías detalladas por Lodesani et al., (2004), posiblemente el aumento de las alteraciones en su morfología, se relacionan con el proceso de criopreservación.

Se capturó 396 zánganos que representó el 100%, de los cuales 152 proporcionaron una muestra viable (38.4%), contrasta con Rousseau., (2015), quien indicó que la proporción de semen depende en gran medida de la edad, tamaño del zángano y la fortaleza de la colmena, por tal motivo, su investigación abarcó un total de 472 zánganos, pero solamente el 55,3% produjeron semen suficiente para la evaluación, al respecto, Seitz et al., (2016), manifiesta que uno de los principales factores que debilitan a la colmena, es la estación invernal, ya que restringe el alimento, haciéndoles susceptibles a la infestación de ácaros (*Varroa*), entre tanto Rhodes et al., (2011), obtuvo hasta un 75% de zánganos que proporcionaron semen, dato que no concuerda con nuestro estudio, probablemente, debido a que emplearon zánganos con edad y tamaño estandarizado y en una época del año favorable, diferente a la de este estudio.

El volumen promedio obtenido de eyaculado por zángano dio como resultado 0,8 μL y una concentración de $2,8 \pm 0.43 \times 10^6$. Para Czekońska et al., (2013), el volumen de semen eyaculado por zángano varía entre 0.5 μL y 1,3 μL , con un promedio de 7.5 millones de espermatozoides por μL y tienden a disminuir con la edad, en tanto que Taylor et al., (2009), obtuvo un volumen de eyaculado por zángano de 1 μL con una concentración promedio de $8,8 \pm 0.98 \times 10^6$ de espermatozoides, aproximándose a los resultados de concentración espermática de $7,39 \times 10^6$ alcanzados por Metz & Tarpy., (2019), en su estudio sobre Senescencia reproductiva en zánganos de la abeja de miel. Estos datos no coinciden con nuestros resultados, debido a que el diseño de la muestra fue al azar, sin considerar el tamaño y edad del zángano, que según Mazeed & Mohanny., (2010), son indicadores claves en la determinación de las características del eyaculado.

Las discusiones de las siguientes variables citan a diferentes especies, relacionadas estrechamente al análisis espermático, debido a que la información en la especie *Apis mellifera* L. es limitada.

Para Avalos Rodriguez et al., (2018) la motilidad masal se valora con una escala del 0 al 5 de manera subjetiva y es definida como el movimiento en remolinos, datos que son corroborados por Al-Lawati et al., (2009), en su estudio llamado "Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee Queens", con base a esta teoría, esta investigación obtuvo una motilidad masal de $2,88 \pm 0,25$ datos que se aproximan a Capel., (2011), quien valoró con 3 la motilidad masal de semen de zángano, posiblemente estos no son tan favorables, debido a las características seminales (alta concentración espermática) del zángano.

Según Gül et al., (2022), la criopreservación y por ende la fertilidad exitosa de espermatozoides de abeja melífera es posible alcanzarla cuando se emplea un protocolo de congelación espermática conjuntamente con un antioxidante apropiado, es así que usar prolina en dosis de 50 mM (mmol), mejora significativamente la motilidad, viabilidad e incluso el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta, potenciando la fertilidad espermática, sin embargo, para lograr éxito en la criopreservación con antioxidantes es dependiente de la dosis del antioxidante escogido.

En esta investigación se obtuvo como resultado de motilidad individual para el tratamiento 1 (sin jalea) un porcentaje de $46,56 \pm 16,80$ %, mientras que para tratamiento 2 (con jalea real) se alcanzó un porcentaje de $40,63 \pm 23,23$, estos datos se aproximan al estudio de Saberivand et al., (2022), quienes experimentaron con una suplementación de jalea real al 1% en la criopreservación de espermatozoides ovino, determinando un valor de motilidad espermática de $42.60 \pm 6,48$, sin embargo, este estudio evaluó diversas concentraciones de jalea, concluyendo que al suplementar con un 2% mejora los parámetros de motilidad.

En tanto que, para Loeza-Concha et al., (2019), en su estudio de criopreservación de espermatozoides de zángano con adición de yema de huevo, obtuvieron una motilidad del 50% concluyendo que, el proceso de congelación reduce significativamente la motilidad espermática, además, en cuanto a los parámetros de viabilidad e integridad de membrana determinaron un 59,10% y un 84,35% respectivamente, datos que son superiores a los obtenidos en este estudio, pero, inferiores a los reportados por Nur et al., (2011), es así que, en base a los datos obtenidos por diferentes autores probablemente, la adición de diferentes suplementos juegan un papel importante en el éxito de la criopreservación espermática de zángano.

Por otra parte Alcay et al., (2016), evaluó este mismo parámetro en caprinos describiendo valores de motilidad de $57,67 \pm 2,58$, no obstante, el porcentaje en su diseño experimental incluyó 0,75 % de jalea real manifestando existen beneficios de la jalea real en concentraciones mayores a 0,5 %, sin embargo, Galarza-Álvarez et al., (2022), resalta que la inclusión de jalea real 0,2 % mejora la cinemática de los espermatozoides de bovino.

En cuanto a viabilidad espermática los resultados obtenidos fueron $40,88 \pm 10,08$ para tratamiento 1 (sin jalea) y $37,13 \pm 11,96$ para tratamiento 2 (con jalea real), en tanto que Kaleem et al., (2017), coincide con el nivel de suplementación de nuestra investigación, sin embargo, los resultados obtenidos divergen, ya que obtuvo $53,60 \pm 0,80$ de viabilidad, por otro lado, Shahzad et al., (2016), alcanzó un valor de $67,0 \pm 3,8$ para este parámetro, no obstante, el porcentaje de inclusión de jalea real que manejo fue del 0,1 %. Con base a lo antes mencionado, se propone investigar la dosis más idónea, para potenciar los beneficios antioxidantes de la jalea real dependiendo de la especie.

Esta investigación no demostró efectos favorables de la jalea real al 1%, sobre la criopreservación de espermatozoides de zángano, sin embargo, para Kaleem et al., (2017), los parámetros estructurales y funcionales del espermatozoide mejoran la calidad durante la criopreservación, con una suplementación de jalea real del 1%, así también, para Moradi et al., (2013), la jalea real provee efectos protectores debido a su propiedad antioxidante, sin embargo, es necesario estimar las concentraciones de suplementación más idóneas, además es preciso verificar la autenticidad de la jalea real ya que es muy susceptible a perder sus propiedades.

4 CONCLUSIONES

La evaluación del efecto de la suplementación de la jalea real al 1 % no demostró un efecto significativo sobre las características funcionales de los espermatozoides de zángano durante el proceso de criopreservación.

Las características de morfología espermática presentan un porcentaje reducido de anomalías (7%), sin embargo, se incrementan durante el proceso de criopreservación, mientras que, el promedio de volumen eyaculado ($0,8 \mu L$) y la concentración de $2,8 \pm 0,43 \times 10^6$ se encuentran dentro de los rangos admisibles.

Los parámetros de viabilidad y motilidad no evidenciaron beneficios post congelación con la incorporación de jalea real, sin embargo, el porcentaje de daños a la integridad de la membrana presenta una leve disminución, aun así, no demuestra una diferencia significativa.

Finalmente, se concluye que la suplementación de jalea real al 1% a los crioprotectores no representa un beneficio relevante en la calidad espermática frente a crioprotectores no suplementados.

5 RECOMENDACIONES

Replicar el estudio con nuevos porcentajes de inclusión de jalea real, como suplemento a los crioprotectores y tomando en consideración una época del año diferente al invierno.

Estandarizar la muestra experimental en base a parámetros de edad para mejorar la eficiencia de la colecta.

Estudiar el comportamiento reproductivo de esta región en comparación con otros continentes.

Tener en cuenta el tiempo transcurrido entre la captura y extracción de la muestra seminal, para evitar pérdidas por muerte.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkader, F., Kairo, G., Tchamitchian, S., Cousin, M., Senechal, J., Crauser, D., Vermandere, J. P., Alaux, C., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Barbouche, N., & Brunet, J. L. (2014). Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie*, 45(2), 215–223. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0240-7>
- Abdelnour, S. A., Abd El-Hack, M. E., Alagawany, M., Taha, A. E., Elnesr, S. S., Abd Elmonem, O. M., & Swelum, A. A. (2020). Useful impacts of royal jelly on reproductive sides, fertility rate and sperm traits of animals. In *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (Vol. 104, Issue 6, pp. 1798–1808). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jpn.13303>
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Andrological Evaluation of Male Infertility. *Andrological Evaluation of Male Infertility*, 73–77. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5>
- Aizen, M. A., & Harder, L. D. (2009). The Global Stock of Domesticated Honey Bees Is Growing Slower Than Agricultural Demand for Pollination. *Current Biology*, 19(11), 915–918. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.071>
- Al-Lawati, H., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2009). Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. *Journal of Insect Physiology*, 55(2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.10.010>
- Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Mulkpınar, E., Gokce, E., Ustuner, B., Sen, H., & Nur, Z. (2019). Successful cryopreservation of honey bee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, 87(March), 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.005>
- Alcay, S., Toker, M. B., Onder, N. T., & Gokce, E. (2016). Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 74, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.011>
- Alçay, S., Üstüner, B., Çakmak, İ., Çakmak, S., & Nur, Z. (2015). Farklı kriyoprotektanların eritme sonrası arı sperm kalitesi üzerine etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21(1), 31–35. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2014.11515>
- Avalos Rodriguez, A., Gonzales Santos, J. A., Vargas Ibarra, A. K., & Herrera Barragan, J. A. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://www.medigraphic.com/pdfs/reproduccion/mr-2009/mr094b.pdf>
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. <https://doi.org/10.18597/rcog.468>
- Barrera, A. (2004). *Cría de abejas reina*. <http://repositorio.iica.int/handle/11324/7062>
- Björndahl, L., Söderlund, I., & Kvist, U. (2003). Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18(4), 813–816. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg199>
- Blum, M. S., Glowska, Z., & Taber, S. (1962). Chemistry of the Drone Honey Bee Reproductive System. II. Carbohydrates in the Reproductive Organs and Semen. *Annals of the Entomological Society of America*, 55(1), 135–139. <https://doi.org/10.1093/aesa/55.1.135>
- Bose, S., Sengupta, P., Ghorai, N., & Ghorai, C. N. (2016). A preliminary report on the

- reproductive system of a polistine wasp *Ropalidia montana* Carl (Hymenoptera: Vespidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS*, 307(43), 307–313.
- Bratu, I. C., Igna, V., Simiz, E., Dunea, I. B., & Pătruică, S. (2022a). The Influence of Body Weight on Semen Parameters in *Apis mellifera* Drones. *Insects*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/insects13121141>
- Bratu, I. C., Igna, V., Simiz, E., Dunea, I. B., & Pătruică, S. (2022b). The Influence of Body Weight on Semen Parameters in *Apis mellifera* Drones. *Insects*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/insects13121141>
- Brito, L. F. C., Althouse, G. C., Aurich, C., Chenoweth, P. J., Eilts, B. E., Love, C. C., Luvoni, G. C., Mitchell, J. R., Peter, A. T., Pugh, D. G., & Waberski, D. (2016). Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology*, 85(9), 1507–1527. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.002>
- Cobey, S. W., Tarpy, D. R., & Woyke, J. (2013). Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 52, Issue 4). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.09>
- Collins, A. M. (2004). Functional longevity of honey bee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *Journal of Apicultural Research*, 43(4), 167–171. <https://doi.org/10.1080/00218839.2004.11101131>
- Coskun, N., Kaan, O., Tayyar, C., & Karaca, F. (2020). Effect of royal jelly on quality of chilled semen from damascus buck. *CESICA 2020 Journal of Veterinary Andrology*, 5(1), 7–17.
- Czekońska, K., Chuda-Mickiewicz, B., & Chorbiński, P. (2013). The influence of honey bee (*Apis Mellifera*) drone age on volume of semen and viability of spermatozoa. *Journal of Apicultural Science*, 57(1), 61–66. <https://doi.org/10.2478/jas-2013-0007>
- Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M., & Hopkins, B. K. (2016). Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 279–283. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1243292>
- De Araujo Freitas, C., & Quezada Euan, J. J. (2011). *Las abejas reinas en los sistemas apícolas*. 4(2), 28–31.
- Dumitrescu, C. S., Sălășan, C., Peț, E., Stanciu, S. M., & Raul, P. (2022). Aspects regarding the evolution of apiculture. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management, SGEM*, 22(6.2), 675–682. <https://doi.org/10.5593/SGEM2022V6.2/S29.85>
- Dumitru, C. D., Neacsu, I. A., Grumezescu, A. M., & Andronescu, E. (2022). Bee-Derived Products: Chemical Composition and Applications in Skin Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, 14(4), 1–29. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040750>
- Egea De Prado, M. D., Roy Pérez, T. J., Cebrián Blázquez, J. E., Masot Gomez-Landero, A. J., & Cardenal Galván, J. A. (1990). *Estudio Del Espermatozoide En El Macho De La Colmena De « Apis Mellifera L .»*. 83–89.
- Galarza-Álvarez, L., Guanga, J., Lucero, J., Samaniego, X., & Galarza Lucero, D. A. (2022). La suplementación con jalea real a los medios de congelación y vitrificación mejoran la criosupervivencia de espermatozoides de toro. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 30(Sup. 2), 87–89. <https://doi.org/10.53588/alpa.300615>
- Gontarz, A., Banaszewska, D., Gryzinska, M., & Andraszek, K. (2016). Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season.

- Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 40(5), 598–602. <https://doi.org/10.3906/vet-1511-6>
- Gül, A., Yıldız, C., Coşkun Çetin, N., & Yalçın, O. K. (2022). Effect of Ascorbic Acid and Proline Amino Acid Supplementations on Cryosurvival and Fertility Rates of Cryopreserved Honey Bee (*Apis mellifera*) Semen. *Biopreservation and Biobanking*, 20(6), 551–556. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0077>
- Gulov, A. N., & Bragina, Y. E. (2022). Morphofunctional Changes in Frozen-Thawed Sperm of *Apis Mellifera* Linnaeus Drones. *Russian Agricultural Sciences*, 48(6), 512–520. <https://doi.org/10.3103/s1068367422060040>
- INTAGRI. (2019). *La polinización del cultivo del Arándano o Blueberry*. 28, 4.
- Kaleem, M., Rehman, A., Mehmood, U., Sattar, M. A., & Sciences, A. (2017). *Effects of Royal Jelly on post thaw semen quality parameters of Beetal Buck*. 1482317240, 1495–1498.
- Kapil, R. P. (1962). Anatomy and histology of the male reproductive system of *Apis indica* Fab. (Apidae, Hymenoptera). *Insectes Sociaux*, 9(1), 73–90. <https://doi.org/10.1007/BF02224581>
- Katel, S., Mandal, H., & Timsina, S. (2022). *Summary of Apiculture*. August.
- Klein, C. D., Kozii, I. V., Wood, S. C., Koziiy, R. V., Zabrodski, M. W., Dvylyuk, I., De Mattos, I. M., Moshynskyy, I., Honaramooz, A., & Simko, E. (2021). Testicular Changes of Honey Bee Drones, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), during Sexual Maturation. *Journal of Insect Science*, 21(6). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab049>
- Klowden, M. J. (2013). Reproductive Systems. In *Physiological Systems in Insects*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415819-1.00004-0>
- Kouas, H., & Adjlane, N. (2020). International Journal of Natural Resources and Environment. *International Journal of Natural Resources and Environment*, 2(1), 14–20.
- Kumar, S., & Yadav, T. (2021). *Apiculture*. December, 50–65.
- Lara, J. M. (2019). *Biología, toxicología y terapéutica de especies venenosas de interés veterinaria en Nicaragua* [Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/3925/>
- Locke, S. J., Peng, Y. -S, & Cross, N. L. (1990). A supravital staining technique for honey bee spermatozoa. *Physiological Entomology*, 15(2), 187–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00506.x>
- Lodesani, M., Balduzzi, D., & Galli, A. (2004). Functional characterisation of semen in honeybee queen (*A.m.ligustica* S.) spermatheca and efficiency of the diluted semen technique in instrumental insemination. *Italian Journal of Animal Science*, 3(4), 385–392. <https://doi.org/10.4081/ijas.2004.385>
- Loeza-Concha, H., Vivas-Rodríguez, J., Domínguez-Rebolledo, Á., Escalera-Valente, F., Copas-Medina, K., & Ramón-Ugalde, J. (2019). Efecto de la yema de huevo sobre la criopreservación espermática de zángano (*Apis mellifera*). *Abanico Veterinario*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.21929/abavet2019.921>
- Mazeed, A. M., & Mohanny, K. M. (2010). Some reproductive characteristics of honeybee drones in relation to their ages. *Entomological Research*, 40(5), 245–250. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2010.00297.x>
- Metz, B. N., & Tarpy, D. R. (2019). Reproductive senescence in drones of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insects*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/insects10010011>
- Moradi, A. R., Malekinejad, H., Farrokhi-Ardabili, F., & Bernousi, I. (2013). Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small Ruminant Research*, 113(2–3), 346–352.

- <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.03.003>
- Nur, Z., Seven-Cakmak, S., Ustuner, B., Cakmak, I., Rturk, M. E., Bramson, C. I. A., Irkaya, H. S. A. Ğ., & Oylu, M. K. S. (2011). *Original article The use of the hypo-osmotic swelling test , water test , and supravital staining in the evaluation of drone sperm.* 31–38. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1>
- Özkavukçu, S. (2002). Cryopreservation: Basic Knowledge and Biophysical Effects. *Journal of Ankara Medical School*, 001–010. https://doi.org/10.1501/jms_0000000030
- Paillard, M., Rousseau, A., Giovenazzo, P., & Bailey, J. L. (2017). Preservation of Domesticated Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *Journal of Economic Entomology*, 110(4), 1412–1418. <https://doi.org/10.1093/jee/tox149>
- Parihar, A., Kumar, A., Panda, U., Khan, R., Parihar, D. S., & Khan, R. (2023). Cryopreservation: A Comprehensive Overview, Challenges, and Future Perspectives. In *Advanced Biology* (Vol. 7, Issue 6, p. 2200285). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/adbi.202200285>
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6), 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- Ramu, S., & Jeyendran, R. S. (2013). *The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity.* 927, 21–25. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_3
- Rhodes, C. J. (2018). Pollinator decline – An ecological calamity in the making? *Science Progress*, 101(2), 121–160. <https://doi.org/10.3184/003685018x15202512854527>
- Rhodes, J. W., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D. L., & Wheen, G. (2011). Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, 42(1), 29–38. <https://doi.org/10.1051/apido/2010026>
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Domínguez-Rebolledo, Á., Loeza-Concha, H., Castellanos-Zacarias, C., Tun-Moo, M., & Ramón-Ugalde, J. (2020). Efecto de los antioxidantes Trolox y Crocina sobre la criopreservación del semen de ovino Pelibuey. *Abanico Veterinario*, 10(1). <https://doi.org/10.21929/abavet2020.4>
- Saberivand, A., Pashapour, S., Noghani, A. E., & Namvar, Z. (2022). Synergistic effect of royal jelly in combination with glycerol and dimethyl sulfoxide on cryoprotection of Romanov ram sperm. *Cryobiology*, 104, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.05.006>
- Schlüns, H., Schlüns, E. A., Van Praagh, J., & Moritz, R. F. A. (2003). Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie*, 34(6), 577–584. <https://doi.org/10.1051/apido:2003051>
- Seitz, N., Traynor, K. S., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, E., Ellis, J. D., Rose, R., Tarpy, D. R., Sagili, R. R., Caron, M., Delaplane, K. S., Rangel, J., Lee, K., Baylis, K., Wilkes, J. T., Skinner, J. A., Pettis, J. S., Seitz, N., Traynor, K. S., ... James, T. (2016). *Una encuesta nacional sobre las pérdidas anuales de colonias de abejas melíferas gestionadas en 2014-2015 en EE . UU . 8839.* <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1153294>. Para
- Shahzad, Q., Mehmood, M. U., Khan, H., Husna, A. ul, Qadeer, S., Azam, A., Naseer, Z., Ahmad, E., Safdar, M., & Ahmad, M. (2016). Royal jelly supplementation in semen extender enhances post-thaw quality and fertility of Nili-Ravi buffalo bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 167, 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.010>
- Taylor, M. A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., & Buhr, M. M. (2009). Improving viability

- of cryopreserved honey bee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology*, 72(2), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.012>
- Wegener, J., & Bienefeld, K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77(3), 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.036>
- Wiese, H., & Salomé, J. A. (2020). *Nova Apicultura* (Agrolivros (ed.)).
- Yániz, J. L., Silvestre, M. A., & Santolaria, P. (2020). Sperm quality assessment in honey bee drones. *Biology*, 9(7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biology9070174>
- Yániz, J., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Gosálvez, J., López-Fernández, C., & Santolaria, P. (2013). Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(4), 598–603. <https://doi.org/10.1111/rda.12132>

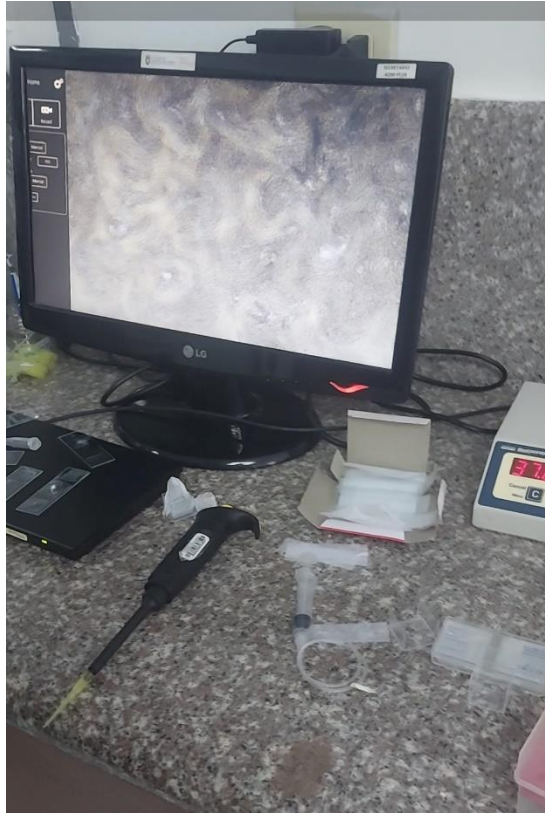
7 ANEXOS



Anexo 1. Entrevista al señor Hipólito Alberca



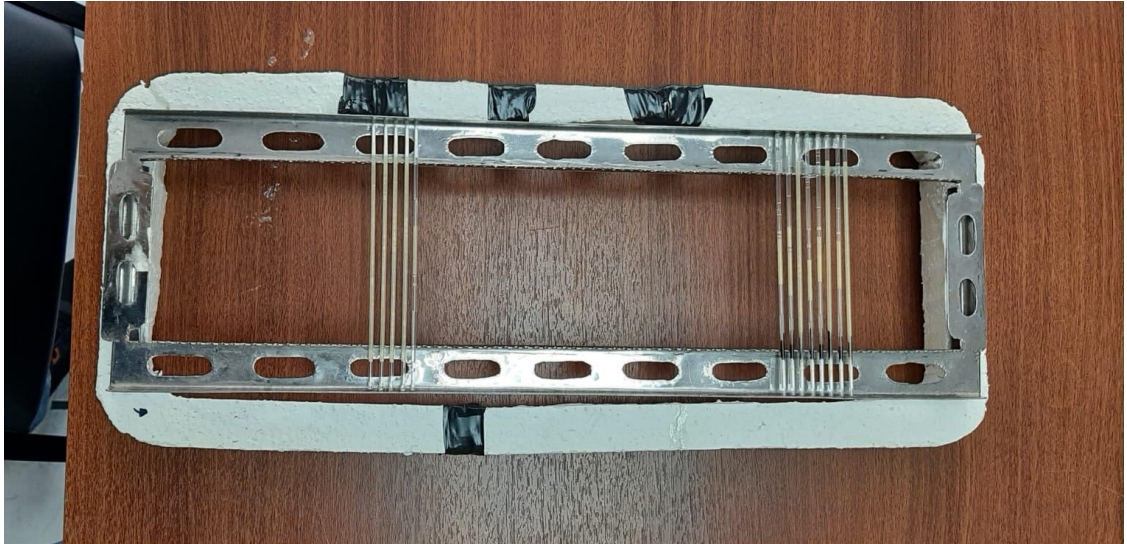
Anexo 2. Captura y traslado de los zánganos.



Anexo 3. Análisis de semen fresco



Anexo 4. Proceso de empajillado las muestras para la crio preservación



Anexo 5. Colocación de las pajuelas para la criopreservación



Anexo 6. Cámara de criogenización con las muestras.



Anexo 7. Análisis post descongelación de las muestras espermáticas

Carlos Fernando Enríquez Duma portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105623466** y **Jonathan Santiago Lalvay Quezada** portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0105936900**. En calidad de autores y titulares de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**CARACTERIZACIÓN DE SEMEN DE ZÁNGANO Y EFECTO DE LA JALEA REAL EN LA CRIO PRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconocemos a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizamos además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **9 de agosto de 2023**



Carlos Fernando Enríquez Duma

C.I. 0105623466



Jonathan Santiago Lalvay Quezada

C.I. 0105936900