



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**EFFECTO DE LA JALEA REAL EN LA
CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EN GALLOS.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO**

AUTORA: MICHELLE SABRINA MERCHÁN LOJANO

DIRECTOR: Dr. ANDRÉS LEONARDO MOSCOSO PIEDRA, MGS

CUENCA- ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**EFFECTO DE LA JALEA REAL EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE
SEMEN EN GALLOS**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO**

AUTORA: MICHELLE SABRINA MERCHÁN LOJANO

DIRECTOR: Dr. ANDRES LEONARDO MOSCOSO PIEDRA, MGS

CUENCA-ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Michelle Sabrina Merchan Lojano portadora de la cédula de ciudadanía N.º **0107400889**. Declaro ser el autor de la obra: **“EFECTO DE LA JALEA REAL EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EN GALLOS”**, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro 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. Declaro finalmente que mi 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 me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **09 de abril de 2024**



Michelle Sabrina Merchan Lojano

C.I. **0107400889**

CERTIFICACION

Yo, Andrés Leonardo Moscoso Piedra, con cédula de identidad N.º 0104156443 en calidad de Director del Trabajo de Titulación con el tema: EFECTO DE LA JALEA REAL EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EN GALLOS, certifico que el presente trabajo fue desarrollado por MICHELLE SABRINA MERCHAN LOJANO, bajo mi supervisión.

ANDRES
LEONARDO
MOSCOSO
PIEDRA

Firmado digitalmente por ANDRES
LEONARDO MOSCOSO PIEDRA
Fecha: 2024.04.17 16:46:59 -0500'

Dr. Andrés Moscoso Piedra

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a dos seres muy especiales que amo tanto que a pesar de los años y la distancia me han brindado su amor infinito, sus consejos, su apoyo incondicional para cada una de mis metas a mis queridos padres Rosa y Geovanny.

A mis hermanos Iván, Paola y Marjorie, hoy en día los extraño, ustedes fueron mi apoyo fundamental y pusieron su confianza en mí.

A mi Tutor Dr. Andrés Moscoso y al Ing. Manuel Maldonado por compartir sus conocimientos y por la pasión por lo que hacen.

Al Dr. Rafael Yunga y Dr. Juan Diego Yunga por ser un ejemplo de inspiración por compartir sus conocimientos con pasión y brindarme su amistad.

A todos mis amigos y familiares quienes estuvieron conmigo en cada una de estas etapas de mi vida universitaria.

ÍNDICE GENERAL

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

CERTIFICACION

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	11
2.1. Jalea Real como crioconservante	11
2.2. Propiedades fisicoquímicas de la jalea real	12
2.3. Proceso de crioconservación de semen de gallos.....	13
2.4. Diluyente	14
2.5. Agentes crioprotectores (ACP).....	15
2.6. Evaluación de calidad del semen.....	16
2.7. calidad del semen.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Área de estudio	17
3.2. Obtención y evaluación de semen	18
3.3. Variables evaluadas	18
3.4. Diseño experimental	20
4. RESULTADOS.....	20
5. DISCUSIÓN	23
6. CONCLUSIONES	25
7. BIBLIOGRAFIA.....	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Integralidad de la Membrana de Espermatozoides de Gallos de Traspatio con relación a la.....	21
Figura 2. Viabilidad de la Membrana de Espermatozoides.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Análisis de Kruskall y Wallis de la Integralidad de la Membrana (Host).....	22
--	----

RESUMEN

En el Ecuador el 22% del volumen de la producción Aviar es representado por la cría de aves traspatio por lo que las prácticas alrededor de esta actividad requieren mayor profundización. La reproducción de estas aves está asociada a una conducta natural, sin embargo, la variabilidad genética de estas no permite estandarizar algunos procesos que brinden mayores rendimientos. La Jalea Real por su parte es un compuesto rico en nutrientes y micronutrientes, beneficiosos y algunos potencialmente tóxicos. El uso de las biotecnologías de la reproducción, ofrecen una opción para este fin. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto wal adicionar Jalea Real como alternativa para su criopreservación, para lo cual se extrajo muestras seminales de 4 gallos mediante masaje dorso-abdominal para su posterior evaluación frente a dosis de 0,25%, 0,50%, 0,75% y 1,00% de Jalea, por 5 repeticiones. En vista de los resultados poco prometedores de esas dosis se adicionó una dosis menor de 0,025%, la cual sufrió afecciones de menor severidad, tras la evaluación de permeabilidad e integralidad de la membrana, por lo que la crioconservación del semen de gallo con Jalea Real presenta varios factores bioquímicos como podría ser el efecto del ácido 10-hidroxi-2-decenoico o factores metodológicos como el tiempo de estabilización del semen, que deben ser mayormente estudiados para justificar su efectos negativo, sin embargo al no existir literatura específica del tema, esta investigación genera bases para poder concluir que la Jalea Real tiene efectos letales y subletales sobre el semen de gallos de traspatio.

Palabras clave: Permeabilidad, Integralidad, Efectos Letales, Masaje Dorso-Abdominal

ABSTRACT

In Ecuador, 22% of the volume of poultry production is represented by backyard chicken farming, which is why this activity needs to be further developed. The reproduction of these birds is associated with a natural behavior; however, the genetic variety of these birds does not enable standardizing some processes that provide higher performances. Royal Jelly is a compound rich in nutrients and micronutrients, some of which are beneficial and others potentially toxic. The use of reproductive biotechnologies offers an alternative for this purpose. The aim of this study was to evaluate the effect of adding Royal Jelly as an alternative for cryopreservation. Seminal samples were extracted from 4 roosters by dorso-abdominal massage and then evaluated against doses of 0.25%, 0.50%, 0.75%, and 1.00% of Jelly, in 5 repetitions. Considering the unpromising results of these doses, a lower one of 0.025% was added, which showed less severe effects, after evaluating the permeability and integrity of the membrane; thus, the cryopreservation of rooster sperm with Royal Jelly has various biochemical factors such as the effect of 10-hydroxy-2-decenoic acid or methodological factors such as the sperm stabilization time. that need to be further studied to justify their negative effects. However, as there is no specific literature on the subject, this research provides a basis for concluding that Royal Jelly has lethal and sublethal effects on backyard rooster sperm.

Keywords: Permeability, Comprehensiveness, Lethal Effects, Dorso-Abdominal Massage

1. INTRODUCCIÓN

La crioconservación es una técnica derivada de la biotecnología cuyo origen ha sido producto de diversos avances científicos y tecnológicos aplicados al área de la salud que implica, entre otras cosas, la manipulación de células, tejidos, órganos, la reproducción asistida, la bioinformática, ingeniería genética y molecular. Su objetivo principal es mantener las células funcionales y una viabilidad espermática durante un ciclo de congelación entendiéndose el efecto que ésta tiene sobre los sistemas celulares (Santiago-Moreno et al., 2019).

A nivel nacional existe una demanda al mejoramiento productivo y a su vez la inclusión de técnicas que puedan optimizar el proceso, por ello conlleva a la necesidad de estandarizar un protocolo de congelación y descongelación aplicada a la y técnica de crioconservación de semen de gallos para que exista una mayor uniformidad en los resultados y evitar daños estructurales, bioquímicos y funcionales que reduzca la supervivencia de los espermatozoides (Toalombo, 2020).

La Jalea Real (RJ) es un sustancioso nutriente producido por la hipofaringe y glándulas mandibulares de las abejas obreras de 4 a 14 días, la Jalea Real es un alimento de los zánganos y obreras hasta su tercer día, las larvas reinas hasta el quinto día y las reina adulta toda su vida, la composición de basa principalmente en agua (60–70 %), cantidades considerables de proteína (27–41%) y lípidos (8–19%),carbohidratos (30%), otros componentes son las vitaminas (A, B) que tiene efectos antioxidantes y las vitaminas (C,D,E), sales minerales y aminoácidos(Reyes & Miranda, 2013). Lo cual implica a realizar estudios con la necesidad de utilizar nutrientes suplementados con diluyentes de bases sintéticas usados en la crioconservación como en el caso de la Jalea Real. Estudios evidenciaron un incremento en la motilidad y capacidad fecundantes del esperma crioconservado (Galarza Lucero et al., 2022). Por ello esta investigación tiene como objetivos la incorporación de Jalea Real como agente crioconservante favorecerá las características cualitativas y cinéticas en el semen de gallos de traspatio en relación con la dosis empleada para determinar el efecto de la jalea real sobre la crioconservación de semen de gallo de cría traspatio, se evaluará el efecto en diferentes dosis de la Jalea Real y poder definir una concentración optima de la Jalea Real en la crioconservación de semen de gallos de cría traspatio del cantón Cuenca.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Jalea Real como crioprotector

En la industria ganadera, se ha investigado la aplicación de la jalea real como crioprotector en esperma de animales de granja, como bovinos, porcinos y ovinos (El-Sheshtawy et al., 2016). La utilización de sustancias crioprotectoras para mejorar la gestión del plasma seminal en el proceso de congelación del semen de cabra determinó que los crioprotectores alternativos como la JR y fitoquímicos han demostrado ser eficaces en términos de las tasas de motilidad y viabilidad después de la descongelación estos compuestos se presentan como prometedores aditivos a los diluyentes de semen, ya que protegen la membrana espermática contra el estrés oxidativo, mantienen la integridad del acrosoma y del ADN, y potencialmente previenen la formación de cristales de hielo durante la criopreservación (Ramírez, 2023).

En Cuenca Ecuador en el 2023 se realizó un estudio con el objetivo de analizar los efectos positivos de la adición de jalea real como agente crioprotector en el proceso de congelación de semen de zángano se utilizaron diluyentes enriquecidos con un 1% de jalea real y un diluyente comercial basado en TCG (Tris, ácido cítrico, glucosa) junto con yema de huevo y DMSO. Teniendo como resultados que al agregar un 1% de jalea real a los crioprotectores no aporta mejoras significativas en la calidad del esperma de zángano en comparación con los crioprotectores que no contienen esta suplementación (Enríquez & Lalvay, 2023).

Al evaluar la Jalea Real diferentes parámetros del esperma con tratamientos que consisten en diferentes concentraciones de JR, es decir, 0, 1.5, 3 y 4.5 ml de Jalea Real por cada 100 ml y en distintos momentos 24 y 48 horas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los datos recolectados señalan que la inclusión de 1.5, 3 y 4.5 ml de Jalea Real por cada 100 ml de diluyente en las muestras de semen de carnero generó mejoras notables en la calidad del esperma. Estas mejoras se reflejaron en un aumento estadísticamente significativo ($P < 0.05$) en el porcentaje de motilidad avanzada de los espermatozoides, al mismo tiempo que se observaron reducciones

significativas en los porcentajes de espermatozoides muertos, anomalías espermáticas y daños en el acrosoma durante el período de almacenamiento a bajas temperaturas durante 48 horas (Jhord, 2017).

Al examinar los efectos de la jalea real en el semen de bovino después de la descongelación y su capacidad de fertilización en entornos tanto *in vitro* como *in vivo*. En el primer experimento, se observó que la adición de RJ en diversas concentraciones 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 o 0,4% tuvo un impacto positivo en la movilidad progresiva, la viabilidad, la integridad de la membrana celular, el estado del acrosoma y la integridad de la cromatina del esperma. Se encontró que la concentración del 0.1% de RJ resultó ser la más efectiva (Tenempaguay & Zhumi, 2022).

2.2. Propiedades fisicoquímicas de la jalea real

La Jalea Real es un líquido viscoso de tonalidad blanquecina que se produce en las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las abejas obreras. Su consumo está restringido exclusivamente a lo largo de toda la vida de la abeja reina (Salamanca et al., 2013). La jalea real presenta propiedades antivirales, antimicrobianas y antitóxicas, y contribuye a reducir la presión arterial y la frecuencia cardíaca debido a su contenido de acetilcolina (Barragán et al., 2022).

La Jalea Real y sus componentes han sido objeto de diversas investigaciones sobre su actividad antimicrobiana, debido a sus extensos usos tradicionales y a una posible aplicación futura en la medicina por lo que se ha informado sobre las actividades antimicrobianas de la misma debido a: la Royalisina, el ácido 10-hidroxi-2-decenoico, las Jelleinas y algunas otras proteínas que actúan contra diversas bacterias (Fratini, 2016).

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, la jalea real posee propiedades biológicas tales como antioxidante, antibacteriana, antialérgica, antitumoral, antiinflamatoria, antihipertensiva y antienvjecimiento aplicadas

principalmente en animales de experimentación (El-Sheshtawy et al., 2016) (Salamanca et al., 2013).

El contenido de agua representa aproximadamente el 65,3% del total, dejando un residuo seco de alrededor del 34,7%. Este residuo seco se divide en diferentes categorías, incluyendo un alto porcentaje de proteínas (48,2%), con una amplia variedad de aminoácidos presentes, como alanina, valina, glicina, isoleucina, leucina, prolina y otros (Salamanca et al., 2013). Los carbohidratos constituyen un 1,6% del residuo seco, mientras que los lípidos representan un 3,0%. Además, se encuentran cenizas con un contenido del 1,6%. La jalea real también contiene diversas vitaminas, como la A, D, E, varias del complejo B (B1, B2, B6, B12), ácido pantoténico, niacinamida (vitamina PP), ácido ascórbico, ácido fólico e inositol (Moutsatsou et al., 2010). Contiene una sustancia llamada ácido 10-hidrodecenóico, que se reconoce por sus propiedades antibióticas, se caracteriza por ser un coloide ácido, con un pH que oscila entre 3,6 y 4,2 (Broto, 1989).

2.3. Proceso de crioconservación de semen de gallos

La adición de cualquier sustancia al medio espermático genera estrés osmótico, sin importar que sea benéfico o no dado que aumenta la osmolaridad del medio, donde las células tienden a deshidratarse para compensar la fuerza osmótica, donde el nivel de afectación se genera por el volumen y permeabilidad celular (Ávila Portillo, et al. 2006).

El proceso para crioconservar tiene como objetivo minimizar los daños celulares que ocurren en periodo de congelación y descongelación de los espermatozoides, están producen deterioro principalmente a nivel de la membrana celular ruptura de membrana, (desnaturalización, desplazamiento de proteínas de membrana y ruptura de la membrana), siendo principal objetivo de este procedimiento es minimizar los daños celulares que ocurren durante la congelación y descongelación celular (Avalos Rodríguez et al., 2013).

Estos daños afectan principalmente la membrana plasmática, la membrana mitocondrial y el acrosoma del espermatozoide, así como los microtúbulos que conforman su flagelo provoca estas alteraciones en la membrana y los microtúbulos, y también puede causar cambios en las características morfométricas de la cabeza del espermatozoide (Avalos Rodríguez et al., 2013).

Estas técnicas se dividen en función de la velocidad de enfriamiento y descongelación de las células espermáticas. En la congelación lenta, la temperatura desciende gradualmente controlada por un congelador programable, y se añaden crioprotectores en pasos discretos. La descongelación lenta se lleva a cabo de manera similar con un congelador programable, mientras que la descongelación rápida se realiza a temperatura ambiente o mediante un baño maría para evitar la recrystalización del agua (Duchi et al., 2009).

La vitrificación se basa en la congelación ultra rápida y utiliza una combinación de crioprotectores que, al enfriarse, no forma cristales, sino que se convierte en una sustancia viscosa similar al vidrio sin estructura cristalina, evitando la formación de hielo. En cuanto a los protocolos de congelación, la etapa de enfriamiento es crucial para permitir que los espermatozoides se adapten a un metabolismo reducido. El semen diluido se enfría gradualmente hasta alcanzar los 5°C. La congelación se realiza en nitrógeno líquido, ya sea manualmente o de manera automatizada, y la descongelación debe ser rápida para lograr una recuperación eficiente de los espermatozoides (Barragán et al., 2022).

2.4. Diluyente

En la criopreservación de semen de gallos, se utilizan varios tipos de diluyentes para proteger y preservar la viabilidad y la función de los espermatozoides durante el proceso. funcionar como una solución tampón para mantener el pH adecuado, suministrar nutrientes y antibióticos, los sistemas tampón son componentes del diluyente que ayudan a mantener el pH en un rango entre 6,9 y 7,1, contrarrestando la acidificación causada por los productos del metabolismo de los espermatozoides, como el ácido láctico, que puede disminuir la viabilidad de otros espermatozoides (Duque & Castaño, 2016). La criopreservación implica la suspensión del semen en diluyentes con crioprotectores, lo que permite su almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido, facilitando así la creación de un banco de genes y simplificando su manejo. (Thibier & Guerin, 2000).

Diferentes tipos de disolventes que tienen un impacto significativo en el éxito de la criopreservación y la supervivencia de los espermatozoides. Estos diluyentes se

utilizan en diversos protocolos como LAKE 71 y LAKE RAVE 84, siendo este último el diluyente más utilizado para LAKE RAVE 84. Los más comunes son los diluyentes Lake o Sexton, que cumplen con los niveles de presión osmótica requeridos y pueden contener varios sistemas de amortiguación (Celis et al., 2014)

2.5. Agentes crioprotectores (ACP)

Los crioprotectores son compuestos que protegen a los espermatozoides de los efectos adversos de la congelación. Hay dos tipos de crioprotectores: intracelulares y extracelulares (Avalos Rodríguez et al., 2013). Los crioprotectores intracelulares tienen la función de sustituir el líquido del interior del espermatozoide por el crioprotector, lo que provoca una contracción de la célula y evita su ruptura por la formación de cristales de hielo en el medio externo. Los más reconocidos son el glicerol, el etilenglicol, la dimetilformamida y el dimetilsulfóxido, siendo el glicerol el más utilizado. Por otro lado, los crioprotectores extracelulares inducen una rápida deshidratación de los espermatozoides y los más comunes incluyen sacarosa, dextrosa, glucosa y dextrano (Curbelo & Rodríguez, 2013).

En cuanto a sustancias nutricionales, se menciona la yema de huevo y la leche, que contienen lecitina (fosfatidilcolina). Esta lecitina parece proteger la membrana celular restaurando los fosfolípidos celulares que pueden perderse durante los cambios bruscos de temperatura (Orozco et al., 2019).

Los crioprotectores más utilizados en el semen de gallos son el glicerol y la dimetilacetamida (DMA). Estas sustancias se emplean para proteger y preservar los espermatozoides durante el proceso de congelación, ayudando a evitar daños por la formación de cristales de hielo. El glicerol y la DMA son componentes esenciales en la criopreservación exitosa de semen aviar (Blanch et al., 2008) (Orozco et al., 2019).

La variación de respuesta frente a los diferentes crioprotectores se da también en el plasma seminal, donde los componentes de aves han sido poco estudiados, aunque son muy diferentes a la de los mamíferos (Marzoni, et al. 2013).

2.6. Evaluación de calidad del semen

Se realiza mediante varios métodos, y uno de ellos es el proceso de tinción con eosina nigrosina y yoduro propidio. Estos reactivos se utilizan para evaluar la viabilidad de los espermatozoides y determinar su calidad (Caycho, 2016).

2.6.1. Eosina nigrosina

Para la identificación de la vitalidad el proceso más habitual es la tinción vital estas nos permitirán diferencial de espermatozoides vivos y muertos debido a la capacidad de los colorantes vitales para atravesar la membrana plasmática. Se utiliza para evaluar la integridad que protege y sostiene la membrana plasmática de los espermatozoides cuando los espermatozoides tienen membranas plasmáticas dañadas, la eosina penetra en la célula y tiñe su citoplasma de color rojo, lo que indica una baja viabilidad. Los espermatozoides con membranas plasmáticas intactas no se tiñen y se consideran viables (Toro-Montoya, 2009).

2.6.2. Yoduro propidio

Este reactivo también se utiliza para evaluar la viabilidad de los espermatozoides cuando se aplica, se tiñe el núcleo de los espermatozoides. Los espermatozoides con núcleos teñidos se consideran no viables, ya que esto indica daño en el material genético de la célula (Montes, 2012).

2.7. calidad del semen

Para evaluar la calidad del semen en gallos, es importante considerar el volumen, la concentración espermática y azoospermia. Estos parámetros proporcionan información crucial sobre la capacidad reproductiva del gallo y su salud (Avalos Rodríguez et al., 2013).

El color normal del semen en gallos es blanco o ligeramente opalescente. Es importante destacar que el semen de gallo no suele ser completamente transparente este color blanco lechoso se considera normal en gallos saludables y reproductivamente aptos. Si se presenta un color diferente al blanco lechoso o si cambia significativamente su coloración, podría indicar un problema en la calidad del semen o la salud del gallo cambios de color anormales. Amarillo o verde un cambio en el color del semen a tonos podría indicar infección, inflamación o presencia de pus en el tracto reproductor del gallo

(Maricela & Villacres, 2020). Rosado o rojo podrían indicar sangrado en el tracto reproductor, esto puede ser un signo de lesiones o problemas en los órganos reproductores del gallo. Transparente o acuoso podría ser un signo de baja concentración espermática o una dilución excesiva del semen (Maricela & Villacres, 2020).

El volumen espermático incluye el plasma seminal y los espermatozoides el eyaculado como en la cantidad total de espermatozoides presentes y depende principalmente de su estado fisiológico, método de recolección, siendo la cantidad promedio de semen por eyaculación de 0.5 a 1 ml. Esta cantidad puede ser influenciada por diversos factores, como la edad del gallo y su estado de salud (Juárez et al., 2018).

La concentración espermática normal en gallos varía, pero generalmente se encuentra en un rango de la concentración espermática puede llegar a variar de manera significativa dependiendo de la especie. En gallos juveniles se ha observado una concentración de 3.0 a 7.0 x10⁹ de células por ml. Un gallo saludable y reproductivamente apto debería tener una concentración espermática dentro de este rango (Contreras, 2021).

La azoospermia no es normal en gallos sexualmente maduros y reproductivamente activos. La presencia de azoospermia indica un problema grave en la producción de espermatozoides o en la función de los órganos reproductores del gallo puede ser causada por infecciones, lesiones, problemas hormonales u otros trastornos (Maricela & Villacres, 2020).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

La investigación se realizó Laboratorio de Reproducción de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias, UCACUE, Km 2 y ½. Se desarrollo la investigación en 4 gallos de 12 meses de edad criados en la parroquia Turi de ciudad de Cuenca que fueron criados de forma tradicional, obteniendo un peso similar entre las 5 y 6 libras, con una condición corporal de 5/5, la fertilidad fue probada previo a la investigación sobre la calidad seminal. Se realizó la extracción del semen de cada gallo y se procedió a crear

un pul en base al proyectó Relación de los parámetros de la calidad espermática como bioindicadores del bienestar animal, en aves de traspatio de los sistemas agro-productivos periurbanos de Cuenca.

3.2. Obtención y evaluación de semen

Se les desparasitó previamente 15 días antes de la obtención de la muestra, se realizó corte del plumaje de cada gallo, posterior se utilizó gentamicina al 2% para la limpieza de la cloaca, para la extracción de semen se realizó la técnica descrita por (Burrows & Quinn, 1935), que consiste en un masaje dorso abdominal empezando por el sacro y el cóccix y cola, terminando con un masaje suave sobre la cloaca con el dedo pulgar e índice de la mano derecha hasta proyectar la salida de los cuerpos folicos consiguiendo así la expulsión del semen, una vez obtenida la muestra se obtuvo con un total de 4 eyaculados los cuales fueron recolectados en un tubo eppendorf. Se procedió a colocar el diluyente a la misma proporción del semen obtenido. Se envolvió en papel aluminio y procedimos a trasportarla en un cooler con hielo hacia el laboratorio. Las eyaculaciones fueron analizadas inmediatamente para evaluar su volumen, concentración, motilidad individual y masivo, así como el porcentaje de espermatozoides con membranas celulares normales o anormales.

3.3. Variables evaluadas

Se evaluó motilidad masal (MM; %), se evaluó con el uso de una platina precalentada (37 °C), colocando una gota de semen puro (10 µl) sobre una lámina portaobjetos en el microscopio óptico con lente de 10x, y de acuerdo con el movimiento observado se asignó un puntaje de escala arbitraria de 1 a 5, (donde 1 = 25% y 5 = 100% de espermatozoides móviles). La motilidad individual (MI; %), se determinó en base a la proporción de espermatozoides progresivamente móviles, para ello, se colocó una gota (10µL) de semen sobre la cámara neubauer fue cubierta con una laminilla cubreobjetos; posteriormente se observó al microscopio Olympus BX51 Japón con lente de 40x. la viabilidad espermática (VE; %).

3.3.1. Criopreservación del semen.

Para realizar el proceso de criopreservación se preparó las dos fracciones en tubos de falcón, 1 fracción (diluyente - muestra seminal y Jalea Real Testigo (0%), Tratamiento 0,25%, Tratamiento 0,50%, Tratamiento 0,75% y Tratamiento 1,00%), 2 fracción (diluyente y DMA), se procedió a diluir el semen utilizando el diluyente LAKE RAVI en una proporción de 1:1 por cada 200 millones de espermatozoides. Luego la muestra fue refrigerada 5°C durante 30 minutos para separar exclusivamente los espermatozoides, estos fueron suspendidos en un diluyente de congelación que contiene un 9% de dimetilacetamida (DMA) durante 10 minutos. se unieron las dos fracciones los contenidos de los tubos de falcón. Una vez se colocaron en pajillas de 0,25 cc, posteriormente se sellaba con alcohol polivinílico en su extremo. Al finalizar este periodo, fueron sumergidas una caja de poliestireno para someterlas a vapores de nitrógeno sometido a un proceso de enfriamiento durante 4 minutos por un tiempo de 1 minuto y finalmente se sumergieron las pajillas en nitrógeno líquido hasta alcanzar temperaturas de -196°C, quedando almacenadas en un termo de criopreservación.

3.3.2. Descongelación del semen

Para realizar la descongelación seleccionó al azar unas pajillas y un macrotubo en cada eyaculado fueron descongelados a temperatura de 4 °C durante 3 minutos. Para proceder a evaluar la mortalidad progresiva después de la descongelación seguidamente se cortaron los dos extremos de la pajilla y se depositó su contenido en un tubo Eppendorf debidamente rotulado en un baño maría.

3.3.3. Integridad de la membrana post descongelamiento

Para llevar a cabo este análisis procedimos a colocar con una pipeta 20 µL de la muestra post descongelada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y 50 µL de HOST, se homogeneizó la muestra y se procedió a incubar a 35°C en la platina termorreguladora por un tiempo de 45 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.

3.3.4. Morfología post descongelamiento

Para valorar la variable de morfología espermática se preparó una muestra de 3 μL y manejamos la tinción de Eosina-nigrosina en una medida de 3 μL , se colocó una se homogeneizó la muestra sobre un portaobjetos realizando un frotis, posteriormente se analizó en el microscopio.

3.3.5. 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 50 μL de muestra seminal y agregando 3 μL de Yoduro de propidio dejando que actúe por 15 minutos, para el análisis se realizó un frotis con la preparación, después se observó utilizando un microscopio fluorescente.

3.4. Diseño experimental

Se realizó una colecta diaria de cuatro gallos mediante masaje abdominal, generando una sola muestra total. Se estableció un experimento mediante el modelo de un Diseño Completamente al Azar (DCA), con cinco tratamientos y cinco repeticiones. Los tratamientos evaluados fueron: Testigo (0%), Tratamiento 0,25%, Tratamiento 0,50%, Tratamiento 0,75% y Tratamiento 1,00%. De las muestras en fresco se realizó el análisis de las diferencias estadísticas mediante una regresión, además de un análisis de Kruskal y Wallis ($p < 0,05$). Posteriormente se agrupó a los tratamientos frente al testigo y frente a una concentración de 0,025% que fue analizada por la misma prueba. De las muestras postcongelación se describieron únicamente los resultados.

4. RESULTADOS

Para comprender si la incorporación de Jalea Real como agente crio conservante favorece las características cualitativas y cinéticas en el semen de gallos de traspatio, en relación con las Concentración empleada se evaluó de forma descendente su efecto sobre la integralidad de la membrana según la prueba de Host, donde la respuesta se

observa en la Figura 4. Integralidad de la Membrana de Espermatozoides de Gallos de Traspatio con relación a la Concentración de Jalea Real.

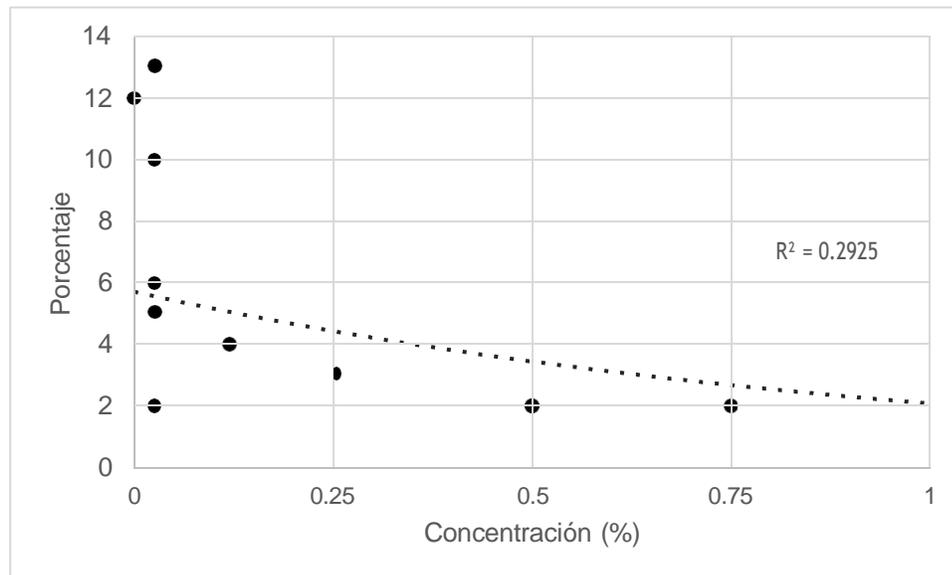


Figura 1. Integralidad de la Membrana de Espermatozoides de Gallos de Traspatio con relación a la Concentración de Jalea Real

Con respecto a la relación entre variables es de carácter moderado ($R=0,487$). El análisis de Kruskal y Wallis ($p<0,05$), entre concentraciones determinó que el Testigo ($13,20\% \pm 4,4$) y la concentración de $0,025\%$ ($7,20\% \pm 4,3$) tienen valores similares, que difieren estadísticamente ($p=0,010$), frente a las demás concentraciones ($0,12\% = 4\% \pm 1,1$; $0,25\% = 3\% \pm 1,1$; $0,50\% = 2\% \pm 0$; $0,75\% = 2\% \pm 0$; $1,00\% = 5\% \pm 1,2$), por lo que estas concentraciones afectan significativa la integralidad de la membrana, mientras concentraciones bajas no difieren estadísticamente con el Testigo. La diferencia entre grupos se visualiza en el Cuadro 1. Análisis de Kruskal y Wallis de la Integralidad de la Membrana (Host). En este análisis se muestra que el Testigo 0% y a el de Concentración $0,025\%$ no presentan diferencias entre sí, sin embargo, también se observa que existe un efecto de la Jalea Real que afecta la membrana a $0,025\%$, sin que difiera con el resto de Las concentraciones.

Cuadro 1. *Análisis de Kruskal y Wallis de la Integralidad de la Membrana (Host).*

Grupo	Media	D.E.	p	Valor
Testigo 0%	13,2 ^a	4,44		
Testigo 0,025%	7,2 ^{ab}	4,32		0,002
0,25%;0,50%,0,75%,1%	3,1 ^b	1,21		

Al realizar la prueba de viabilidad de Eosina, identificó que en concentración de 0,5% y 0,75% no hubo células vivas, mientras que a 0,25% hubo 3%±0,71 y al 1% hubo 3%±0,71. Por su lado el Testigo 0% tuvo valores de 4,40%±2,88 y el de concentración de 0,025% tuvo valores de 6,20%±2,88, sin que haya diferencias significativas entre concentraciones (0,252), mientras las relaciones son moderadas (R=0,476), según se observa en la Figura 5. Viabilidad de la Membrana de Espermatozoides de Gallos de Traspatio en Relación a la Concentración de Jalea Real.

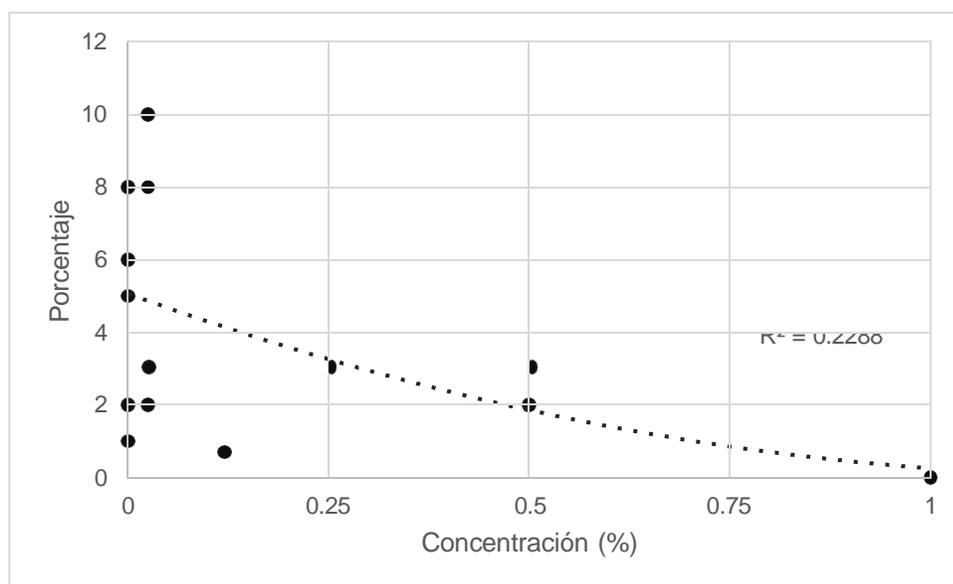


Figura 2. Viabilidad de la Membrana de Espermatozoides

La prueba de Permeabilidad determino que la mayoría ($p > 0,05$) de los espermatozoides no presentaron esta cualidad, por lo que su congelamiento los afectaría considerablemente. Comparando con el estudio de Moscoso, et al (2022), bajo condiciones similares, que al evaluar Glicerol se pudo aducir que el semen de los gallos sufrieron daños producto de la Jalea Real además de que existen problemas ambientales que afectan la vitalidad espermática producto del manejo y transporte de muestras, producto de distancia y tiempo del laboratorio. Tras esta experiencia se congelo las muestras y al descongelar y analizar en el Sistema CASA, la mortalidad fue del 100%, por lo que se decidió no graficar esta respuesta.

Estos datos contrastan notablemente con cualquier investigación en gallos donde en fresco tienen alta motilidad y por ejemplo Ruiz et al., (2023), quienes obtienen una Integralidad superior al 80% en muestras frescas.

5. DISCUSIÓN

La jalea real ha sido utilizada en varios productos relacionados con la salud, debido a sus diversos compuestos biológicos, que le confieren algunas actividades biológicas y aplicaciones farmacéuticas, a los que la literatura les ha otorgado propiedades como antimicrobianas, antioxidantes, cicatrizantes, inmunomoduladoras, antiinflamatorias, entre otras (Ahmad, 2020). Es así como existe una extensa literatura que ha demostrado los beneficios relativos de la jalea real, específicamente una actividad antioxidante de la misma tanto a nivel sistémico en animales de laboratorio (Cihan, et al 2013), así como a nivel bioquímico en condiciones controladas (Escamilla, et al 2019). Esta propiedad es la que podría brindar beneficios crioprotectores en el semen de animales, sin embargo, esta misma literatura nos indica que este producto por sus propiedades antimicrobianas podría, afectar a nivel celular la actividad espermática.

El efecto de la jalea real sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides bovinos es mayor cuando se utiliza dosis de 0,4%, y mientras mayor sea la concentración la cinética disminuye (Abd-Allah, 2010). Algunos de los factores de estudio de esta investigación fueron validados ya en el Azuay, donde se determinó que la dosis de 0,2% ofrecía mayor progresividad en las muestras descongeladas de semen bovino, más no tiene un efecto positivo en la vitrificación de este. (Galarza-Álvarez, et

al. 2022) Así también en el Azuay una nueva dosis del 1%, también fue testeada pero esta vez en semen de zánganos, ofreciendo beneficios limitados en la calidad espermática (Enríquez-Dumas y Lalavay-Quezada, 2023).

Frente a esta realidad se pudo evidenciar en esta revisión que las dosis altas de Jalea Real (>0,5%) no deberían ser utilizadas en células germinales de animales por su bajo efecto, mientras el uso de dosis de 1% 0,75% 0, 50%, 0,25% o inclusive menores son capaces de afectar de forma letal o subletal los espermatozoides ocasionando la muerte de los espermias de gallos de traspatio. Esto se evidencio en este estudio, por lo que si se plantea seguir investigando la Jalea Real en esta especie es necesario.

Cuando se trabaja con material espermático es necesario considerar el tiempo entre la colecta y el proceso de crio conservación, por ellos indagar en estudios que han trabajado con Jalea Real manifiestan que el tiempo afecta significativamente la calidad espermática y que el uso de Tris o Vitamina C resulta en algún caso primordial para potencializar la actividad antioxidante en el material y así poder conservar la muestra (Abd-Alah, 2010). A partir de esto, debemos considerar que este estudio conto con un periodo de transición entre la colecta y el trabajo superior a una hora, y bien las muestras eran hábiles y mostraron valores de motilidad y vitalidad consistentes, la adición de agentes externos en muestras afectadas por el tiempo pudo afectar la respuesta final.

El tiempo que transcurre entre la toma de muestra con la inseminación o entre la toma de muestra y su procesamiento afecta significativamente su calidad incrementando el número de espermatozoides muertos (Moya, et al. 1997). Otro de los factores que afecta la calidad es el procedimiento empleado para el manejo del material genético (Moscoso, et al. 2022²) e inclusive el propio biotipo del animal (Moscoso, et al. 2022¹). La calidad espermática se verá también afectada por factores estacionales (Ordaz Contreras, 2022) por lo que la fragilidad de la muestra puede ser un producto de una variación mínima de tan solo uno de estos factores u otros factores, que pudieron restar la vitalidad de las muestras.

Otro posible factor que puede afectar y tener varios efectos sobre los seres vivos, es la propia composición de la Jalea. La jalea real es una secreción de las abejas que ha sido objeto de revisiones recientes sobre su composición, propiedades y conservación, su composición de la Jalea real está dada por 60% agua y el 40% restante por proteínas

y lípidos, además de vitaminas y minerales (Vit, 2005). La jalea real es una emulsión de proteínas, azúcares y lípidos en agua. Contiene alrededor del 1.5% de sales minerales, principalmente cobre, zinc, hierro, calcio, manganeso, potasio y sodio, así como pequeñas cantidades de flavonoides, polifenoles y vitaminas. Entre los flavonoides presentes se encuentran hesperetina, isosakuranetina y naringenina, y también contiene aminoácidos libres como lisina, prolina, cisteína, ácido aspártico, entre otros posee propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y atenuantes del estrés oxidativo (Kocot, et al. 2018).

Por lo que bajo estas condiciones la incorporación de Jalea Real como agente crioconservante perjudica las características cualitativas y cinéticas en el semen de gallos de traspatio sin importar las dosis o microdosis, empleadas, por lo cual es necesario profundizar en estudios sobre los componentes bioquímicos de la jalea y su efecto en las células germinales de las aves.

6. CONCLUSIONES

Al evaluar el efecto de Jalea Real se determinaron que no existieron efectos positivos significativos en el proceso de crioconservación del semen de gallos de cría traspatio, demostrando un efecto negativo en la calidad de los espermatozoides antes y después de del proceso de la crioconservación. Por lo cual no se encontró una concentración óptima para la jalea real en proceso de crioconservación de semen de gallos criollos del Cantón Cuenca. La incorporación de Jalea Real como agente crioconservante no favorece las características cualitativas y cinéticas en el semen de gallos de traspatio en relación con la dosis empleada.

Se recomienda replicar el estudio con menores porcentajes de inclusión de jalea real utilizando y otros sistemas de dosificación por ejemplo microlitros (μL). además de tener en cuenta el tiempo transcurrido entre la obtención y extracción de la muestra seminal, para evitar pérdidas por de gametos.

Por último, es necesario considerar el proceso de la obtención de la Jalea Real y su pureza, para garantizar homogeneidad de resultado.

7. BIBLIOGRAFIA

- Avalos Rodríguez, A., Gonzales Santos, J. A., Vargas Ibarra, A. K., & Herrera Barragán, J. A. (2013). Recolección y manipulación seminal in vitro. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue).
<https://www.medigraphic.com/pdfs/reproduccion/mr-2009/mr094b.pdf>
- Barragán, J. A. H., Huitrón, J. M., Pérez-Rivero, J. J., Sánchez, A. G., Rodríguez, A. Á., Torres, A. M. R., & Flores, R. C. (2022). Effect of viscosity on the medium for rooster (*Gallus gallus*) sperm cryopreservation. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 13(1), 175–186. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V13I1.5917>
- Blanch, E., Tomás, C., Sansano, S., Gómez, E. A., Casares, L., & Giménez, I. (2008). *Calidad in Vitro Del Semen Crioconservado De Gallos De La Raza Gallina Valenciana De Chulilla. Resultados Preliminares*. 407–409.
- Broto, P. (1989). Composición y propiedades de la jalea real. *La Vida Apícola*, 36, 4. https://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/composicion_propiedades_Jalea_Real.pdf
- Burrows, W. H., & Quinn, J. P. (1935). *A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl Don't already have an Oxford Academic account Register Oxford Academic account*.
- Caycho, K. S. (2016). *Nuevos métodos integrados de evaluación de la calidad seminal en vacuno*.
- Celis, Á. D., Antonio, A. R. B. G. U. S., & Alexandra Montoya Páez, J. D. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de Investigación*, 11(2), 63–70. <https://doi.org/10.22507/rli.v11n2a7>
- Contreras, R. O. (2021). *Calidad de semen de gallos criollos en dos estaciones del año*.

- Curbelo, M., & Rodríguez Rodríguez, Z. (2013). *RELEVAMIENTO DE LABORATORIOS DE PROCESAMIENTO DE SEMEN BOVINO EN URUGUAY*. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/2730>
- Duchi, N., Almela, L., Peinado, B., & Remacha, A. (2009). Criopreservación de semen de gallo: una alternativa para la recuperación y conservación de la gallina de raza murciana. *Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)*, 1979, 1–5. https://www.agroecologia.net/recursos/publicaciones/publicaciones-online/2009/eventos-seae/cds/congresos/actas-bullas/seae_bullas/verd/posters/4_P.GANADERIA/10_CRIOPREDSERVACION.pdf
- Duque, N. A. D., & Castaño, P. A. L. (2016). *Protocolos de criopreservación de semen bovino*. 1–23. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/4af87dc9-7d24-4bac-95b8-3560ab56f475/content>
- El-Sheshtawy, R. I., El-Badry, D. A., El-Sisy, G. A., El-Nattat, W. S., & Abo Almaaty, A. M. (2016b). Natural honey as a cryoprotectant to improve Arab stallion post-thawing sperm parameters. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(4), 331–334. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.06.004>.
- Galarza Lucero, D. A., Guachichullca, L. M., & Hernández, J. P. (2022). Efecto de la L-carnitina y la melatonina sobre la criosupervivencia y fertilidad de espermatozoides de gallos criollos (*Gallus domesticus*). *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 30(Sup. 2), 107–110. <https://doi.org/10.53588/alpa.300620>
- Jhord, C. B. (2017). Relevancia de la miel de abeja en el diluyente de semen sobre la calidad del semen de carnero almacenado en refrigeración. *J. Animal and Poultry Prod., Mansoura Univ*, 8(1), 1–5. <http://www.animalesyanimales.com/>
- Juárez, C., Jiménez, A., Gutiérrez, V., & Segura, C. (2018). Efecto de la edad sobre la calidad del semen en gallos rhode island rojos. *Actas Iberoamericanas En Conservación Animal (AICA)*, 11, 11–18.

- Maricela, A., & Villacres, Q. (2020). *Universidad estatal amazónica facultad de ciencias de la tierra carrera de ingeniería agroindustrial*.
- Montes M., M. (2012). Evaluación de la calidad espermática y ensayos preliminares en Criopreservación de espermatozoides de Lenguado *Paralichthys Adspersus* (Steindachner, 1867). *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 80. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/575>
- Moutsatsou, P., Papoutsi, Z., Kassi, E., Heldring, N., Zhao, C., Tsiapara, A., Melliou, E., Chrousos, G. P., Chinou, I., Karshikoff, A., Nilsson, L., & Dahlman-Wright, K. (2010). Fatty acids derived from royal jelly are modulators of estrogen receptor functions. *PLoS ONE*, 5(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015594>
- Orozco, C. V., Lorena, A., Osorio, B., Londoño, M. F., Javier, A., & Morales, R. (2019). Inseminación artificial en aves de corral. *Programa 2 Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Tecnológica de Pereira. Docente Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Tecnológica de Pereira.*, 1–38.
- Ramirez Ramírez, D. A. (2023). Uso de crioprotectores que permitan optimizar el manejo del plasma seminal en la criopreservación del semen caprino: Revisión sistemática. *Universidad Cooperativa de Colombia Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Bucaramanga, Colombia.*,1–42.
- Reyes, A. N. O., & Miranda, C. F. (2013). Comportamiento del consumidor y aceptación de un producto de miel de abeja con jalea real. *Slideshare.Net*, 2(1), 545–555. <https://www.slideshare.net/ALBICEE/lembar-observasi-siswa-50178674>
- Salamanca, G., Osorio, M., & Reyes, L. (2013). Parámetros fisicoquímicos de calidad de la jalea real elaborada por *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), en Colombia. *Zootecnia*31(4),311–324.
- Santiago-Moreno, J., Bernal, B., Pérez-Cerezales, S., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M. C., Gutiérrez-Adán, A., López-Sebastián, A., Gil, M. G., Woelders, H., &

- Blesbois, E. (2019). Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: Role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PLoS ONE*, *14*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209910>
- Tenempaguay, J. E. G., & Zhumi, J. I. L. (2022). Efecto de la jalea real suplementada a diluyentes de base sintética y no sintética sobre criosupervivencia de esperma bovino. *UniversidaddeCuenca*, *8.5.2017*, 2003–2005. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/40331/1/Trabajo-de-Titulación>
- Thibier, M., & Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, *62*(1–3), 233–251. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00161-5)
- Toalombo, P. A. (2020). *Caracterización Morfológica, Productiva Y Genética De La Gallina Criolla Del Ecuador*. 1–319.
- Toro-Montoya, A. (2009). Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, *15*(5), 145–170.



Michelle Sabrina Merchan Lojano portadora de la cédula de ciudadanía N.º **0107400889**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“EFECTO DE LA JALEA REAL EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN EN GALLOS”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco 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. Autorizo 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, **09 de abril de 2024**

Michelle Sabrina Merchan Lojano

C.I. **0107400889**