

# UCUENCA

## Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Efecto de la jalea real sobre la capacidad fecundante in vitro de espermatozoides  
bovinos congelados y vitrificados**

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


**Autores:**

Jorge Leonardo Tamay Siguencia

Grace Fabiola Uzhca Tenesaca

**Director:**

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

**Cuenca, Ecuador**

2023-11-09

## Resumen

La jalea real (RJ) es un producto de la secreción de las glándulas cefálicas de las abejas nodrizas que debido a su poderosa composición proteica y antioxidante, se ha usado en la criopreservación de espermatozoides. En este sentido, esta investigación evaluó el efecto de la jalea real capacidad fecundante *in vitro* de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados. Cuatro tratamientos fueron evaluados según la suplementación con JR (0 [control] y 0,12% p/v) y el tipo de criopreservación (congelación convencional [CC] y vitrificación [VIT]): CC-JR (n=80 pajuelas); CC-Co (n=80 pajuelas); VIT-JR (n=20 criotubos), y VIT-Co (n=20 criotubos). Cada tratamiento fue evaluado objetivamente su cinemática y la capacidad fecundante mediante un sistema CASA (SCA<sup>®</sup>) y fecundación *in vitro* (200 ovocitos/tratamiento), respectivamente. Los resultados demostraron una mayor cinemática post-criopreservación ( $P < 0,05$ ) con los tratamientos de congelación (CC-JR y CC-Co) que con los de vitrificación (VIT-JR y VIT-Co). El tratamiento de CC-JR produjo mayores ( $P < 0,05$ ) velocidades curvilínea (VCL) y rectilínea (VSL) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) que el tratamiento CC-Co; mientras que el tratamiento VIT-JR produjo únicamente una mayor ( $P < 0,05$ ) BCF comparado con su control VIT-Co. El tratamiento VIT-JR produjo una mayor ( $P < 0,05$ ) tasa (%) de clivaje que el tratamiento CC-Co ( $62,9 \pm 3,53$  vs.  $51,7 \pm 3,25$ , respectivamente). Sin embargo, la tasa (%) de blastocistos a los 7 días posterior a la FIV no difirió ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos: CC-JR:  $9,66 \pm 2,74$ ; CC-Co:  $11,03 \pm 2,45$ ; VIT-JR:  $8,82 \pm 2,54$ ; y VIT-Co =  $7,06 \pm 2,31$ ). En conclusión, la jalea real mejoró algunos parámetros cinéticos de espermatozoides después de la congelación, mientras que sólo mejoró la BCF después de la vitrificación, Además, la JR no produjo ningún efecto sobre la fertilidad *in vitro*.

*Palabras clave:* jalea real, congelación, vitrificación, cinemática, fecundación

*in vitro*

### Abstract

Royal jelly (RJ) is a product secreted by the cephalic glands of nurse bees that, due to its powerful protein and antioxidant composition, has been used in the cryopreservation of spermatozoa. In this regard, this study evaluated the effect of royal jelly on the in vitro fertilizing (IVF) ability of frozen and vitrified bovine spermatozoa. Four treatments were evaluated based on the supplementation with RJ (0 [control] and 0.12% w/v) and the type of cryopreservation (conventional freezing [CF] and vitrification [VIT]): CC-JR (n=80 straws); CC-Co (n=80 straws); VIT-JR (n=20 cryotubes), and VIT-Co (n=20 cryotubes). Each treatment was objectively evaluated for its kinematics and fertilizing capacity using a CASA system (SCA®) and in vitro fertilization (200 oocytes/treatment), respectively. The results showed higher post-cryopreservation kinematics ( $P < 0.05$ ) with the freezing treatments (CC-JR and CC-Co) than with the vitrification treatments (VIT-JR and VIT-Co). The CC-RJ treatment produced higher ( $P < 0.05$ ) curvilinear velocity (VCL) and straight-line velocity (VSL), and beat cross frequency (BCF) than the CC-Co treatment, while the VIT-JR treatment only produced higher ( $P < 0.05$ ) BCF compared to its control VIT-Co. The VIT-JR treatment produced a higher ( $P < 0.05$ ) cleavage rate (%) than the CC-Co treatment ( $62.9 \pm 3.53$  vs.  $51.7 \pm 3.25$ , respectively). However, the blastocyst rate (%) at 7 days after IVF did not differ ( $P > 0.05$ ) among treatments: CC-JR:  $9.66 \pm 2.74$ ; CC-Co:  $11.03 \pm 2.45$ ; VIT-JR:  $8.82 \pm 2.54$ ; and VIT-Co:  $7.06 \pm 2.31$ ). In conclusion, royal jelly improved some kinetic parameters of spermatozoa after freezing, while it only improved BCF after vitrification. Additionally, RJ had no effect on in vitro fertility.

*Keywords:* royal jelly, freezing, vitrification, kinematic, in vitro fertilization

## Índice de contenido

Introducción .....	10
2. Objetivos .....	12
2.1. Objetivo general .....	12
2.2. Objetivo específicos .....	12
3. Revisión de literatura .....	13
3.1. Criopreservación del semen bovino .....	13
3.1.1. Congelación .....	14
3.1.2. Vitrificación .....	14
3.1.3. Criocapacitación .....	15
3.1.4. Agentes crioprotectores .....	15
3.1.5. Diluyentes .....	17
3.1.6. Antioxidantes .....	17
3.1.6.1. TRIS (hydroxymetil amino metano) .....	17
3.1.7. Jalea real .....	18
3.2. Evaluación del Semen .....	19
3.2.1. Sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) .....	20
3.3. Capacidad fecundante in vitro de espermatozoides bovinos .....	21
3.3.1. Etapas de la FIV .....	21
3.3.1.1. Maduración in vitro (MIV) .....	21
3.3.1.2. Fecundación in vitro (FIV) .....	23
3.3.1.3. Cultivo in vitro .....	24
4. Materiales y Métodos .....	25
4.1. Materiales .....	25
4.1.1. Materiales Físicos y de Laboratorio .....	25
4.1.2. Materiales biológicos .....	26
4.1.3. Reactivos .....	26
4.2. Metodología .....	27
4.2.1. Área de estudio .....	27
4.2.2. Medios para la producción <i>in vitro</i> de embriones bovinos .....	27
4.2.3. Diseño experimental .....	29
4.2.3.1. Evaluación de la cinemática .....	29
4.2.3.2. Evaluación de la capacidad fecundante .....	30

4.2.4. Análisis estadísticos .....	31
5. Resultados .....	33
5.1. Cinemática .....	33
5.2. Capacidad fecundante .....	34
6. Discusión .....	36
Conclusiones .....	39
Referencias .....	40
Anexos .....	47

**Índice de figuras**

Figura N° 1 Tasa de división celular (clivaje) de ovocitos fecundados con espermatozoides bovinos congelados (CC-JR y CC-Co) y vitrificados (VIT-JR y VIT-Co) con y sin jalea real. Letras diferentes en cada barra y cada parámetro expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b, P < 0,05).....	34
Figura N° 2 Tasa de producción de blastocistos (desarrollo embrionario) proveniente de espermatozoides bovinos congelados (CC-JR y CC-Co) y vitrificados (VIT-JR y VIT-Co) con y sin jalea real y ovocitos bovinos madurados in vitro. ....	35

## Índice de tablas

Tabla 1: Medio de Maduración in vitro (MIV).....	27
Tabla 2: Medio de Fecundación in vitro (FIV-TL-ST-UMU).....	27
Tabla 3: Medio para la preparación de espermatozoides stock (Sperm-Talp).....	28
Tabla 4: Medio de cultivo in vitro (CIV-CR2).....	28
Tabla 5 Parámetros cinemáticos de espermatozoides bovinos previamente congelados y vitrificados con jalea real.....	33

## Agradecimientos

Queremos agradecer a Dios por guiarnos paso a paso en nuestra trayectoria estudiantil, por darnos la fuerza y perseverancia para seguir adelante y cumplir nuestro objetivo final.

A nuestros familiares y amigos quienes estuvieron apoyándonos moralmente y por cada uno de sus consejos.

Al Doctor Andrés Galarza, por su apoyo incondicional, por haber dirigido nuestra tesis y su constante preocupación y al ayudarnos con su amplio conocimiento, experiencia y paciencia en la realización de este proyecto de tesis.

Un agradecimiento especial al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca por su amable acogida y la prestación de sus servicios, en especial al Dr. Xavier Samaniego, Dr. Mauricio Dumas y al técnico docente Guido Bermúdez, por su ayuda en el desarrollo de la parte práctica y los consejos que nos ayudaron a mejorar cada día.

***Grace & Leonardo***



## **Dedicatoria**

Dedico mi tesis principalmente a Dios, por darme la fuerza necesaria para culminar esta etapa de mi vida. Sin ti nada hubiese sido posible.

A mis padres Julio y Yolanda, que me apoyaron y contuvieron en los momentos malos y en los menos malos. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades sin perder nunca la fe en mí. Me han enseñado a ser la persona que soy hoy, mis principios, mis valores, mi perseverancia y mi fe. Todo esto con amor infinito y sin pedir nada a cambio.

A mis hermanos Cesar, Ismael y Mishell por su paciencia, comprensión y por el apoyo que me han brindado en esta etapa de mi vida.

A mi compañero de tesis, Leonardo, gracias por tu ayuda, paciencia y por los consejos sinceros.

A mis abuelos Norma y Luis, fueron las personas después de mis padres que más se preocupaban por mí. Sus canas son sinónimos de sabiduría, me enseñaron muchas cosas vitales para la vida y me encaminaron por el buen sendero.

A mis tíos por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depara un futuro mejor.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas y a todas aquellas personas que durante estos años estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

**Grace**

## Introducción

La criopreservación de espermatozoides y la inseminación artificial (IA) en el ganado bovino son dos biotecnologías reproductivas que han permitido mejorar genéticamente la descendencia de diferentes razas para alcanzar mayores índices productivos y reproductivos. Las tasas de preñez después de una IA está influenciada, principalmente, por la criosupervivencia celular y las lesiones criogénicas que sufren los espermatozoides tras la descongelación (Abd-Allah, 2010). Los principales daños estructurales se producen a nivel de las membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial durante los procesos de congelación y descongelación, lo que provoca una disminución de la motilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides (Abd-Allah, 2012). De hecho, durante el proceso de congelación, algunos espermatozoides experimentan un estrés osmótico y un desequilibrio entre la deshidratación-rehidratación, lo que se traduce en daño estructural y morfométrico como un encorvamiento del flagelo, aumento de dimensiones y, en consecuencia, un movimiento circular e indeseable (Yáñez-Ortiz et al., 2021). Todos estos efectos deletéreos propios de la criopreservación resultan lesivos para los espermatozoides bovinos.

El estrés oxidativo provocado en la criopreservación de espermatozoides produce un desequilibrio entre el sistema de defensa antioxidante celular y la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS). Las ROS incluyen radicales libres de oxígeno, como el radical hidroxilo (OH<sup>-</sup>), el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estos radicales libres tienden a unirse a la capa lipídica de la membrana plasmática rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), lo que conduce a una peroxidación lipídica (LPO) de la membrana y, en efecto, a la muerte celular (Majeed et al., 2015). Entre los efectos resultantes de la producción de ROS durante la criopreservación se encuentran los cambios que ocurren en el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides (Said et al., 2010). En consecuencia, las ROS desencadenan una disminución de la motilidad, viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados (El-Sherbiny, 2013).

En este sentido, la suplementación con aditivos antioxidantes a los medios de congelación puede ser fundamental para aminorar los efectos nocivos de las ROS, mejorar la crioresistencia y motilidad de los espermatozoides (Moradi et al., 2013).

La jalea real (JR) es un producto natural segregado por las glándulas hipofaríngeas de las abejas nodrizas (de 4 y 11 días de edad) y que sirve para alimentar a las larvas y a la abeja reina adulta (Abd-Allah, 2010). Varios estudios analíticos y farmacológicos han demostrado los beneficios de JR, que incluyen efectos antioxidantes y protectores celulares (Maghsoudlou et al., 2019). Aunque existe información limitada sobre su efecto positivo en la

criopreservación de espermatozoides de rumiantes, roedores y humanos, sus efectos benéficos pueden potencializarse en diferentes diluyentes (Abd-Allah, 2012).

Se cree que el efecto crioprotector de la JR ejercida a los espermatozoides se debe a su composición: aminoácidos (ácido aspártico, cisteína, lisina, valina), vitaminas (C, B y E) y sales minerales (Na, K, Ca, Mg) (Maghsoudlou et al., 2019). Además, se ha atribuido un efecto antioxidante de la JR debido a su gran composición en vitamina “E” y “C”, y su capacidad de eliminar los radicales libres (Shahzad et al., 2016). Por otro lado, se ha determinado que la JR mejora el proceso de capacitación espermática en conjunción con el calcio y la enzima calpaina. La interacción de estos componentes y la reacción con la adenosina y el adenosin monofosfato (AMP) provoca una estimulación de la motilidad ya que inhibe el AMPc (cíclico) a nivel de la cola del espermatozoide y estimula la fosforilación (Amini et al., 2019).

Se han desarrollado algunos trabajos sobre los efectos crioprotector y antioxidante de la JR en la criopreservación de espermatozoides de búfalo (Abd-Allah, 2012; Shahzad et al., 2016), conejo (El-Sherbiny, 2013), carnero (Amini et al., 2019; Moradi et al., 2013) y macho cabrío (Alcay et al., 2017). En toros; sin embargo, se realizaron dos estudios precursores. El primer estudio detallado por Guanga et al. (2022) evaluaron la dosis más idónea de JR suplementada a dos diluyentes, un sintético TCG (tris, ácido, cítrico, glucosa + 6% yema de huevo) y otro de base no sintética ‘UHT’ (leche desnatada + 6% yema de huevo) sobre la motilidad y cinemática de espermatozoides de toro durante 96 horas de refrigeración. Los autores sugirieron que una dosis baja de 0,2% (comparada con 0 [control]; 0,4; 0,6; 0,8; y 1%) de JR suplementada a los diluyentes TCG y UHT (v/v), tuvo un efecto positivo en las variables cinemáticas. Un segundo estudio consecutivo realizado por Galarza-Álvarez et al., (2022) evaluaron el efecto de la suplementación con 0,2 % de la JR a los medios de congelación (TCG + 5% glicerol) y de vitrificación (TCG + 100 mM de sacarosa) sobre la criosupervivencia de espermatozoides de toro. Los autores demostraron que la JR mejoró la cinemática del esperma bovino congelado (en pajuelas de 0,5 ml y usando 5% de glicerol como agente crioprotector penetrante) y vitrificado (en gotas de 30  $\mu$ L usando 100 mM de sacarosa como agente crioprotector no penetrante). Además, determinaron que la JR ejerció un efecto crioprotector de la membrana plasmática durante la vitrificación.

En base a estos dos estudios previos, nosotros nos planteamos la hipótesis de que la suplementación con 0,2% de jalea real a estos diluyentes de congelación y vitrificación podrían mejorar la fertilidad *in vitro* valorada en la tasa de ovocitos fecundados (*in vitro*) y que en su desarrollo embrionario lleguen hasta la etapa de blastocistos.

## 1. Objetivos

### 1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la jalea real sobre la capacidad fecundante *in vitro* de espermatozoides congelados y vitrificados.

### 1.2. Objetivo específicos

- Evaluar la cinemática espermática de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados con jalea real.
- Evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados con jalea real sobre la interacción espermatozoides-ovocitos, clivaje y formación de embriones.

## 2. Revisión de literatura

### 2.1. Criopreservación del semen bovino

La criopreservación de semen es una técnica que inicia desde 1776, cuando el científico italiano Lazzaro Spallanzani le dio por someter el esperma a las frías temperaturas de la nieve. Pero no fue hasta el año 1940 que se superaron las fallas anteriormente observadas, tanto en el proceso de criopreservación como en el almacenamiento del semen, lo que les ocasionaba una marcada reducción de la fertilidad (Forero-Gonzalez et al., 2012).

La criopreservación es una herramienta tecnológica que fue creada con el interés de almacenar y transportar en pequeñas dosis buenas concentraciones de espermatozoides de animales domésticos y utilizarlo por largos periodos de tiempo en inseminaciones artificiales u otras tecnologías reproductivas avanzadas; todo esto sin que existan pérdidas ni alteraciones en sus estructuras y funciones al momento de congelar o vitrificar y descongelar o calentar (Celeghini et al., 2008). El principal objetivo de la criopreservación es conservar la viabilidad y funcionalidad de las células espermáticas expuestas a temperaturas extremadamente bajas (-0) disminuyendo o frenando su actividad metabólica. Sin embargo la crioconservación puede dañar la calidad del esperma y alterar o reducir su funcionalidad (Watson, 1995).

Para contrarrestar o disminuir las alteraciones que se presentaban durante el proceso de crioconservación. En 1940, Phillips & Lardy probaron la yema de huevo como agente crioprotector, donde obtuvieron buenos resultados impulsando su uso en la industria del semen bovino. Años después otros investigadores demostraron que al utilizar el glicerol como crioprotector, se podía mantener la motilidad de los espermatozoides durante la congelación y descongelación (Polge et al., 1949).

Posteriormente, existen investigaciones que han ido probando un sin número de sustancias para evaluar su capacidad crioprotectora sobre los espermatozoides, las cuales han logrado grandes avances, como la adición de antibióticos y citrato de sodio al diluyente, medios adicionados con el afán de que al terminar el proceso de criopreservación la supervivencia de las células espermáticas sean más altas (Grötter et al., 2019).

Además, en 1955 se modificó el método de envasado y congelación del esperma comenzando a utilizar el nitrógeno líquido para el almacenamiento del semen, quedando atrás el uso del dióxido de carbono (Salisbury et al., 1941). Almquist et al., concluyen que la supervivencia de las células espermáticas en el proceso de criopreservación está influenciada mucho más por la descongelación que por la misma congelación.

### 2.1.1. Congelación

El proceso de la criopreservación, se realiza a través de la elaboración de hielo y el congelamiento celular, provocándose una deshidratación o estrés osmótico. Pero estos factores van a depender mucho de la velocidad de enfriamiento. Al formarse el hielo fuera de la célula, se altera el equilibrio isotónico, esto debido a la gran concentración de solutos que hay en el medio extra celular y mientras que en el interior de la célula no se produce ningún cambio. Debido a que existe esta diferencia de concentraciones entre los espacios y gracias a la semipermeabilidad de la membrana se crea una gradiente de concentración de solutos que producen una mayor presión para el espacio con menor concentración. Entonces el agua del interior se evacua al exterior, para luego convertirse en hielo extra celular provocando deshidratación celular. El grado de deshidratación va a depender mucho de la velocidad de enfriamiento, puesto que, si la velocidad es extremadamente rápida, el agua intracelular no alcanzaría a salir por completo produciéndose lo que llamamos cristales de hielo intracelulares (golpe de frío). Por el contrario, si la velocidad de enfriamiento es muy lenta la deshidratación será muy severa produciéndose una reducción del tamaño o forma original de la célula lo que le llevará a provocar deformaciones mecánicas (daño por frío).

Para asegurar la mayor supervivencia de espermatozoides post-descongelación, debemos utilizar una velocidad óptima de enfriamiento y un buen agente crioprotector que facilite un adecuado transporte de agua.

### 2.1.2. Vitrificación

Desde hace pocos años atrás, la vitrificación se ha convertido en el método ideal para mitigar los problemas que ocurrían con los antiguos métodos de congelación, ideal por la razón de que no solo es un método mucho más rápido y barato, sino también porque previene la formación de hielo intracelular, evita la toxicidad del crioprotector y reduce el estrés osmótico (Arav et al., 2002). Esto se debe, a que este método no requiere de una manipulación prolongada, solamente se le pone en contacto a las dosis espermáticas directamente con el nitrógeno líquido, produciéndose así una congelación rápida, que evita las lesiones causadas por el choque de frío y disminuye significativamente la formación de cristales de hielo (Isachenko et al., 2003).

Sin embargo, aunque la vitrificación brinde estas grandes ventajas, la utilización de este método en centros bovinos de inseminación artificial es demasiada baja. Esto a pesar de que varios estudios demostraron mejor funcionalidad espermática con el método de vitrificación que con el método convencional, observando una mayor cantidad de

espermatozoides móviles que mantenían intacta su función mitocondrial e integridad del ADN (Gautam et al., 2015).

### **2.1.3. Criocapacitación**

Además de las células que se dañan o mueren durante el enfriamiento y congelación, otra parte es inducida al fenómeno llamado “criocapacitación”, que produce espermatozoides con una vida útil más corta, lo que reduce inevitablemente la eficiencia general de la fertilización de la muestra espermática (Bailey et al., 2000). Sin embargo esta subpoblación criopreservada, tiene un alto porcentaje de espermatozoides capacitados, razón por la cual se ha observado mediante procesos de fertilización in vitro, a espermatozoides criopreservados de algunos toros, fecundar ovocitos incluso sin la presencia de heparina, medio que es estrictamente necesario para estimular la capacitación in vitro (Cormier et al., 1997). Esto podría explicarse por el aumento de la permeabilidad de la membrana espermática, debido al reordenamiento de los lípidos que es provocado durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación. Es decir este aumento de la permeabilidad de membrana ocasiona la capacitación previa espermática, debido a la salida del colesterol hacia al medio extracelular que permite la entrada de iones como el calcio, entonces al elevarse la concentración de Ca dentro de la célula, puede ser estímulo suficiente para que se empiece una prematura capacitación de los espermatozoides, sin la necesidad de la presencia de la heparina en el medio de fertilización (White, 1993).

Otro efecto que puede suceder en el proceso de criopreservación es la disminución de la integridad funcional y estructural del espermatozoide, provocado por la generación del ROS o estrés oxidativo. Esto sucede por la aparición de radicales libres, que tienen un efecto tóxico, como resultado de una excesiva producción de metabolitos de oxígeno. Estos radicales pueden afectar la motilidad, la activación de enzimas y daña la membrana espermática (Baumber et al., 2005).

### **2.1.4. Agentes crioprotectores**

Los daños celulares originados durante el proceso de congelación-descongelación están amortiguados mediante la incorporación al diluyente de agentes crioprotectores, estos pueden ser de dos tipos, agentes penetrantes (ACP) y no penetrantes ACNP). Los ACP provocan una deshidratación eficiente de la célula cuando se usa velocidades de enfriamiento inicialmente bajas (Ej. 5°C/min); esta deshidratación eficiente se debe al bajo peso molecular de estos ACP (Jeyendran & Graham, 1980). Uno de los ACP más usados para criopreservar espermatozoides bovinos es el glicerol. Y los no penetrantes, como su

nombre lo indica no ingresan a la célula, sino por medio de la diferencia osmótica contribuyen a la extracción del agua intracelular cuando se utilizan velocidades altas de enfriamiento, todo esto debido a su alto peso molecular y un ejemplar común de este grupo es la sacarosa (Pickett et al., 1978).

Hay que aclarar que el verdadero problema desafiante para los espermatozoides, no está en resistir el almacenamiento a la temperatura del nitrógeno líquido sino está en la capacidad que estas tienen para resistir en la etapa intermedia entrando a temperaturas entre -15 y -60 grados centígrados 2 veces, es decir tanto en el proceso de congelación como en el proceso de descongelación (Sieme et al., 2016).

Arav in 1999, presentó un nuevo método de congelación llamado "Multi-Termal-Gradient", con el cual se evita la formación de cristales de hielo dentro y fuera de la célula, esto mediante una congelación direccional, que se enfoca en la trasmisión multidireccional de calor, que ayuda a tener cierto control sobre la velocidad de propagación de la corriente de frío. Además los resultados que se obtuvieron en cuanto a términos de motilidad, viabilidad y tasas de concepción fueron mejores en comparación con el método convencional.

Es importante mencionar que mientras los niveles de concentración de ácidos grasos poliinsaturados y de colesterol en la composición de las membranas de los espermatozoides sean más altas, adquieren una mayor capacidad resistente al choque térmico (Gacitua & Arav, 2005). Esto se pudo comprobar, al comparar espermatozoides de diferentes especies, presentando mayor resistencia los espermatozoides de origen humano y de los conejos, lo cual se atribuye a las altas concentraciones de estos componentes. Por esta razón el grado del daño sufrido por las diferentes velocidades de enfriamiento será determinado por aquellas características mencionadas. Esto se debe a la buena interacción entre las proteínas con los lípidos que se encuentra presentes en buenas concentraciones en la composición de las membranas espermáticas, entonces las proteínas van actuar de manera eficiente como enzimas, receptores o canales iónicos para así lograr el funcionamiento eficaz de las membranas en el punto crítico de la congelación (Jeyendran & Graham, 1980).

La presencia de una reducción en el metabolismo del espermatozoide, alteraciones en la permeabilidad de la membrana espermática, pérdida completa de la motilidad, pérdida de componentes intracelulares y la presencia de un elevado número de espermatozoides muertos son indicadores propios del daño causado por el choque de frío, daños que influyen directamente sobre la viabilidad y fertilidad espermática (Saragusty et al., 2009).



### 2.1.5. Diluyentes

El objetivo principal del uso de diluyentes es brindar la protección suficiente a los espermatozoides durante los procesos adversos en el momento del refrigerado, congelamiento y descongelamiento. Estos componentes no deben ser tóxicos para los espermatozoides, deben ser muy hidrosolubles, tener la propiedad amortiguadora que evite los cambios de pH y suministrar nutrientes para el metabolismo espermático, además estos compuestos pueden tener la capacidad de evitar el crecimiento bacteriano, sin alterarse en el almacenamiento. Es decir, el diluyente debe ser capaz de mantener o mejorar la calidad espermática.

### 2.1.6. Antioxidantes

Un antioxidante se define como una sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones, en comparación con un sustrato oxidable, reduce o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato. Los antioxidantes se usan como aditivos de los medios diluyentes durante el proceso de criopreservación, para aumentar el éxito del protocolo y obtener mejores tasas de motilidad y fertilidad espermática (Rodríguez & Nivia, 2017). En células espermáticas son usados para mitigar los efectos de la criopreservación y adicionalmente retardar o prevenir la oxidación de la membrana lipídica causada por radicales libres, los cuales se producen en la mitocondria a través de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) dependiente de la vía oxidoreductasa y en la misma membrana a través de nicotinamida adenina di-nucleótido fosfatasa (NADP+) dependiente del sistema oxidasa, durante el proceso de congelación y descongelación (Olfati Karaji et al., 2014; Serhat et al., 2014).

A los antioxidantes se les puede clasificar en 2 grupos:

- a. Antioxidantes enzimáticos o naturales, que serían las enzimas encargadas del sistema de defensa antioxidante natural del esperma.
- b. Antioxidantes no enzimáticos, sintéticos o suplementados, entre los más comunes está el ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides, entre otros. (Kefer et al., 2009).

#### 2.1.6.1. TRIS (hydroxymetil amino metano)

El TRIS es uno de los principales componentes más utilizados en los procesos de almacenamiento de semen, este agente de dilución posee sustancias iónicas o no iónicas

que conservan la osmolaridad del medio. El uso de concentraciones de 10 - 50 mm no afecta negativamente la motilidad y el metabolismo de la célula.

### 2.1.7. Jalea real

La Jalea Real es una sustancia producida por las abejas obreras por medio de sus glándulas hipofaríngeas y mandibulares, que sirven para alimentar específicamente a las larvas jóvenes y sobre todo a la abeja reina adulta. Esta sustancia es 60-70% agua pero su parte seca es muy rica en proteínas, aminoácidos, hormonas, lípidos y azúcares (Howe et al., 1985). Pero también contiene cierta cantidad de enzimas, vitaminas como la A, B, C, D, y E, algunas con acción antioxidante; y ciertos minerales importantes como el K, Ca, Na, Zn, Fe, Cu y Mn. Además contiene grandes cantidades de ácidos nucleicos (ADN y ARN); y un sin número de compuestos importantes como esteroides, compuestos de fósforo y acetil colina, los cuales son muy necesarios para la transmisión del impulso nervioso de célula tras célula (Anil et al., 2016). Como es una sustancia con un alto porcentaje de contenido de agua, es de suma importancia mantenerle en refrigeración para su buena conservación, evitar alteraciones y que no pierda su valor nutricional (Abd-Allah, 2010).

Al ser una sustancia compuesta por varios elementos, ésta posee una gran variedad de propiedades y funciones benéficas, razón por la cual ha sido utilizada durante siglos por sus extraordinarios efectos sobre la salud y su uso se ha ido incrementando en los últimos años en varios campos de la industria, debido a los buenos resultados que han obtenido en la mayoría de las investigaciones al usar la jalea real para distintos objetivos (Zheng et al., 2011).

La jalea real se ha reconocido como un excelente suplemento dietético. Varios estudios analíticos y farmacológicos dieron a conocer una amplia gama de actividades biológicas, sobre todo propiedades como antioxidantes y protectores celulares (Sabatini, 2009). Sanafi (2007) demostró, que la jalea real es una alternativa segura y eficaz como tratamiento para la infertilidad masculina, esto mediante un estudio de tres meses de tratamiento con jalea real a hombres infértiles, los cuales presentaron un incremento significativo en la motilidad activa de los espermatozoides y en la concentración de espermatozoides.

En un estudio reciente se demostró el efecto beneficioso en la fertilidad masculina en ratones al suplementarlos con jale real. Otro estudio evaluó la adición de la jalea real al diluyente de congelación del semen de búfalo, obteniendo como resultado una mejora en la calidad del esperma congelado-descongelado (Abd-Allah, 2012).

Moradi et al., (2013), sugiere que la suplementación de jalea real fresca en concentraciones bajas en el diluyente del semen de carnero, mejora la motilidad espermática y la integridad de la membrana, durante el proceso de almacenamiento a temperaturas frías. Años después, Alcay et al., en 2017 también demostraron mejoría en cuanto a los parámetros espermáticos a las 6 horas de incubación en carneros machos, esto al suplementar con jalea real el diluyente de congelación. La jalea real se ha convertido en uno de los productos apícolas más estudiados en la actualidad, aunque todavía queda mucho por revelar sobre su bioquímica y actividad biológica en futuras investigaciones.

## 2.2. Evaluación del semen

Una de las ventajas que tiene los ganaderos al utilizar la inseminación artificial en su ganado, es que solo se usa semen de la mejor calidad, debido a las previas evaluaciones iniciales que se le realiza a la muestra espermática, de cada eyaculado se mide su volumen y concentración espermática para obtener un número aproximado de espermatozoides recolectados (Salisbury et al., 1943). También se le realiza una evaluación visual de una pequeña muestra de espermatozoides para poder observar su motilidad progresiva. Estas evaluaciones previas al procesamiento son muy necesarias para poder conocer información importante sobre la aptitud del eyaculado, el rendimiento reproductivo del ejemplar y el número de dosis que va a producir cada colecta.

William en 1920, fue el responsable de reportar los criterios morfológicos para evaluar los espermatozoides, por lo tanto, las muestras deben tener  $\geq$  al 65% de células normales para poder ser procesadas. En la década de 1960, se volvió posible la clasificación de espermatozoides, gracias al desarrollo de la citometría de flujo, que dio la posibilidad de clasificar, contar y evaluar a estas células, dando un gran impulso a los centros de procesamiento de semen, para obtener mejor control de la calidad del esperma y poder clasificar a los espermatozoides de acuerdo al sexo establecido (Dittrich & Göhde, 1973).

La combinación de la citometría de flujo con la tinción de esperma, permite evaluar varios criterios importantes que definen la calidad del esperma, criterios como la integridad de la membrana, el estado del acrosoma, la energía y la integridad del ADN espermático (Garner et al., 1986).

Los investigadores Lui y Warme (1977), desarrollaron el análisis de esperma computarizado, que consta de sistemas que proporcionan una medición objetiva de la velocidad de los espermatozoides y ayudan a determinar el porcentaje de células de la muestra con motilidad total y progresiva. No obstante, hoy en día, existen sistemas con la posibilidad de valorar la

morfología de los espermatozoides. Sin embargo, a pesar de contar con estas ventajas de evaluar dichas características que competen la calidad del semen, la prueba definitiva siempre será la fertilidad.

### **2.2.1. Sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis)**

La motilidad espermática es considerada una de las características principales que puede determinar la capacidad fertilizante del espermatozoide (Rodríguez-Martínez, 2006), razón por la cual la evaluación de la motilidad antes del proceso de la criopreservación es muy importante para predecir en cierta manera la calidad del esperma post-descongelación (Soler et al., 2017).

Los resultados de la evaluación espermática que se han obtenido con los métodos rutinarios, no siempre se correlacionan positivamente con la fertilidad, generalmente estos pueden ser subjetivos y con cierta variabilidad (Rijsselaere et al., 2012). La diferente experticia de cada técnico, puede llevar a una mayor incidencia de errores sistemáticos, cuando realizamos una evaluación de la motilidad subjetiva (Januskauskas et al., 1999). Por el contrario, el análisis espermático asistido por el sistema CASA, permite una evaluación semiautomática de una mayor cantidad de células espermáticas y en un menor tiempo (Verstegen et al., 2002).

La introducción del sistema CASA por primera vez fue en el año 1980 y con el pasar de los años se ha ido mejorando, desde el análisis de microfotografías hasta llegar a los métodos semiautomatizados que se utilizan hoy en día. Cellsoft y Hamilton Thorn fueron los primeros sistemas semiautomáticos disponibles para la evaluación espermática por análisis de sistemas (Katila, 2001).

Este sistema computarizado es una herramienta innovadora práctica, que nace con la objetividad de mejorar el análisis de la motilidad espermática, reconstruyendo la trayectoria de los espermatozoides y los divide en diferentes categorías, proporcionando resultados más detallados para realizar una mejor evaluación de la calidad y la fertilidad de la muestra de esperma. Mortimer, (2000), fue el responsable de describir varios parámetros cinemáticos que mediante la evaluación computarizada del sistema CASA nos proporciona valores específicos de cada uno. Los diferentes valores de cada parámetro ayudan a determinar el estado fisiológico y la probabilidad de la capacidad fecundante del espermatozoide y por ende estimar la fertilidad del toro (Farrell et al., 1998).

La determinación de subpoblaciones es otro método que nos ayuda a diferenciar los distintos tipos de espermatozoides, que se distinguen a través del análisis de

conglomerados. La presencia de estas subpoblaciones demuestran las diferencias en la morfología, motilidad, longevidad y hasta en su capacidad fecundante (Amann & Waberski, 2014).

Aunque todavía existen ciertas dificultades o factores por resolver antes del uso de este sistema, que pueden alterar los resultados que da el CASA (Mortimer, 1997). La preparación de la muestra antes del análisis es un factor muy importante, controlar ciertos criterios que son cruciales para una buena interpretación por parte del CASA, criterios importantes como la concentración, el volumen de la muestra, el tipo de cámara de recuento, la temperatura y el tipo de diluyente (Carrell & Aston, 2013). Realizar la dilución de la muestra es sumamente importante, ya que la concentración original de la muestra espermática es demasiado alta y no permite una buena interpretación de la ruta de cada espermatozoide (Verstegen et al., 2002).

Kathiravan et al., (2011) consideran que el sistema CASA en comparación con la evaluación subjetiva, es una herramienta más confiable y precisa, para el análisis de motilidad de una muestra espermática y poder determinar su fertilidad. Sin embargo, una desventaja para su uso es la poca disponibilidad en los laboratorios debido a su costo muy alto. También se menciona que no existen pruebas de rendimiento antes de la compra, por parte de los diferentes proveedores de este sistema, es decir estudios que prueben la precisión y la repetibilidad independientemente y comparando entre los diferentes sistemas CASA (Feitsma et al., 2011).

### **2.3. Capacidad fecundante in vitro de espermatozoides bovinos**

La fecundación in vitro (FIV) es una de las nuevas biotecnologías reproductivas, que se va desarrollando hoy en día sobre todo en animales de producción, obteniendo excelentes resultados. Esta técnica también se ha empleado para la producción de miles de embriones utilizados para la investigación. La maduración de ovocitos y el cultivo de embriones fueron técnicas fundamentales para la clonación por transferencia nuclear de células somáticas y la generación de ganado productor de proteínas farmacéuticas en su leche. Una técnica de excelencia utilizada en la reproducción humana asistida, es la fecundación in vitro a través de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, técnica que resulta ser muy factible para emplearla en el ganado bovino (Farin et al., 2006).

#### **2.3.1. Etapas de la FIV**

##### **2.3.1.1. Maduración in vitro (MIV)**

La MIV es el proceso contiguo a la extracción de los COC's y se considera el proceso mediante el cual los gametos femeninos adquieren la competencia para ser fecundados. Esto se debe a que los óvulos recolectados proceden de folículos de poco desarrollo, en fases iniciales de la onda folicular, con tamaños entre 2 y 8 mm (Salgado Cruz & Lopera Vásquez, 2020). Cuando los ovocitos son aspirados desde los folículos terciarios reanudan espontáneamente la meiosis y al ser cultivados in vitro continúan con los procesos de maduración. De este modo la composición de los medios y el ambiente controlado por estufas de cultivo, deben brindar un ambiente adecuado para que la maduración ocurra en 24hs de un modo similar a lo que sucede in vivo durante más de dos ciclos estrales en el bovino. Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios para lograr este ambiente, involucra el uso de medios de cultivo tales como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc.), antioxidantes (glutación, cisteamina, cistina), factores de crecimiento y macromoléculas (suero, albumina), en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 38,5°C y humedad a saturación (Peláez, 2011).

Estos gametos, durante la MIV, logran finalizar su desarrollo y llegar al estadio de Metafase dos (MII), donde adquieren su competencia citoplasmática y genética, pasando desde la reacomodación de sus túbulos hasta la pérdida de un juego de cromosomas (haploides). Al ser un proceso secuencial, el éxito de los procesos siguientes (fecundación y desarrollo embrionario) depende en gran parte del desarrollo de los ovocitos madurados in vitro

La eficacia de la MIV puede verse afectada por factores como: la recolección de los gametos, el método de recolección de los COC's, la temperatura del transporte, en donde temperaturas demasiado altas o muy bajas afectan la competencia ovocitaria, el tiempo de recolección y de transporte de los COC's desde la colecta al laboratorio, en donde tiempos muy altos de procesamiento afectan la viabilidad de los COC's, su estadio de desarrollo, en donde óvulos ya maduros además de ser incompetentes para el proceso de MIV, afectan el rendimiento del lote, el tiempo de maduración (22-24 horas), la composición del medio de maduración y suplementos utilizados, y cambios en la osmolaridad, pH, y uso de o aminoácidos (Salgado Cruz & Lopera Vásquez, 2020; Smetanina et al., 2014)

La suplementación de estos medios de maduración pasa por diferentes sustancias en función del protocolo que se esté implementando. Los principales suplementos en orden de importancia son el suero fetal bovino (FCS), la albúmina sérica bovina (BSA), factores de crecimiento (IGF y EGF), y hormonas como FSH y LH (Sanbuissho & Threlfall, 1990). Tras el proceso de maduración, los aspectos de evaluación morfológica más evidentes son la

expansión de las células del cúmulo y la expulsión del primer corpúsculo polar confirmando el estado de Metafase II (Larsen et al., 1991).

### 2.3.1.2. Fecundación in vitro (FIV)

Una vez transcurrido la MIV, los COC's entran en contacto con los espermatozoides (fecundación propiamente dicha) para la FIV. Este proceso engloba varios eventos relacionados con la manipulación de los gametos masculinos y femeninos. Entre los eventos fisiológicos que ocurren en este periodo se encuentran la capacitación y penetración de los espermatozoides, la unión de los gametos y la formación de los pronúcleos. Un paso esencial es la selección de los espermatozoides más motiles y de mejor condición, en donde además se retiran sustancias no deseadas en el sistema de cultivo como diluyentes y crioprotectores (John J. Parrish, 2014). Entre las técnicas de selección espermática más usadas se encuentran las de migración, como el Swim-Up, y las de lavado selectivo de subpoblaciones a través de centrifugación de gradientes de densidad como el Percoll y el Bovipure (Samardzija et al., 2006). Existen otras técnicas reportadas menos usadas como la migración a través de columnas de ácido hialurónico (Witt et al., 2016) y de moco cervical (Galli et al., 1991).

Los Gradientes de Densidad buscan separar los espermatozoides motiles y viables por medio de la sedimentación-centrifugación. Las células son sedimentadas en un gradiente que se encuentra en equilibrio equivalente con su propia densidad, lo que permite que, mediante la centrifugación, los espermatozoides motiles y viables lleguen al fondo del tubo cónico formando un "pellet", actuando en forma de filtro para el plasma seminal, células redondas, detritos espermatozoides no motiles, diluyentes y crioprotectores (Oliveira et al., 2012). Estos gradientes pueden ser continuos (Ficoll) (Palomo et al., 1999) o discontinuos (Percoll, Bovipure, Puresperm) (Samardzija et al., 2006). Los dos últimos son a base de silicio coloidal y generalmente se utilizan concentraciones de 45 y 90% o 30, 45 y 90% (García-Herreros & Leal, 2014), diluidas en medios inertes o de capacitación, y el tiempo de centrifugación es variable según el protocolo (5-20 min) (Arias et al., 2017).

El proceso de capacitación espermática se desarrolla en condiciones fisiológicas (Hunter, 2012), proceso que en condiciones in vitro se procura realizar durante la selección y fecundación propiamente dicha (John J. Parrish, 2014). Este proceso favorece cambios estructurales en el espermatozoide, mediado por sustancias llamadas "capacitantes" que promueven cambios estructurales y bioquímicos que conducen la eliminación de

componentes adheridos a la membrana del espermatozoide, cambio de la composición lipídica de la membrana espermática, aumento de la permeabilidad a los iones  $Ca^{2+}$ , cambio en el pH interno y un incremento en la permeabilidad y metabolismo celular (Stival et al., 2016) para lograr una correcta penetración y fusión al ovocito.

Tras la selección espermática se determina la concentración, que permite conocer y ajustar la cantidad de espermatozoides que serán colocados con los ovocitos maduros. El conteo se realiza con hemocitómetro o cámara de Thoma (Anzar et al., 2009), y el ajuste suele realizarse a dosis que varían entre 1 y  $6 \times 10^6$  espermatozoides/ml de medio de fecundación, dependiendo del protocolo utilizado (Mohanty et al., 2018). Tras la adición de los espermatozoides al medio de fertilización con los óvulos previamente ubicados, se consolida el cocultivo con los óvulos y espermatozoides en medio de fertilización, por periodos entre 18 y 22 horas en ambiente de alta humedad y protegidos de la luz (J. J Parrish et al., 1988). Para el desarrollo de la FIV se utilizan medios como el TALP, el TCM-199 o el SOF (Mastromonaco et al., 2004), los cuales pueden ir suplementados por distintos componentes, como células oviductales (Yang et al., 1994), células del cúmulus (Chian et al., 1995), BSA (libre de ácidos grasos), heparina (John J. Parrish, 2014)

### **2.3.1.3. Cultivo in vitro**

Trascurrido el tiempo de la fertilización, los presuntos cigotos se retiran del medio de la fertilización in vitro. En primer lugar, se retiran las células de cúmulus adyacentes y luego se les clasifican. Finalmente, los cigotos desnudos y los de mejor calidad pasan al sistema de cultivo (Lenz et al., 1983). La remoción de las células del cúmulus se puede realizar a través de pipeteo fino, con el uso de hialuronidasa, o a través de vórtex (agitación) a los presuntos cigotos (Gordon, 2003). La clasificación de los presuntos cigotos se hace siguiendo el criterio de clasificación ovocitaria para citoplasma, buscando eliminar estructuras con citoplasmas claros u oscuros, en estado de apoptosis o degenerados (Van Soom et al., 2003).

El cultivo embrionario se puede definir como el periodo en el cual se desarrollan las estructuras desde presuntos cigotos hasta blastocistos. Este periodo está comprendido entre el día 1 y el día 7 del desarrollo embrionario. El medio de cultivo es un aspecto fundamental en el cultivo embrionario, ya que este debe proporcionar condiciones óptimas para el desarrollo del embrión (Salgado Cruz & Lopera Vásquez, 2020). El medio de cultivo definido más utilizado en bovinos es el fluido oviductal sintético (SOF), que basa su composición en el fluido del oviducto bovino y es considerado es uno de los que mejor asemeja las condiciones de cultivo en condiciones fisiológicas (Holm et al., 1999). En



general, los medios están compuestos por sales inorgánicas (NaCl, KCl), fuentes energéticas (glucosa, piruvato y lactato 3 de sodio), amortiguadores de pH (NaHCO) y en algunas oportunidades de fuentes proteicas (suplementos) como la BSA (Palasz et al., 2006).

La valoración del desarrollo y la calidad embrionaria son puntos álgidos para conocer la eficiencia y calidad de los sistemas de maduración, fecundación y cultivo. Este se puede realizar al día 2 o 3 de haber realizado la fertilización (estadios de 2-4 o más células) denominado tasa de división o cleavage (clivaje) (Van Soom et al., 2003), al día 5 o 6 (mórulas o mórulas compactas) denominado previsión, y día 7 (blastocistos) o desarrollo embrionario (Maddox-Hyttel et al., 2019) con el fin de producir y seleccionar los embriones con las mejores cualidades a transferir buscando obtener el mayor número de gestaciones. La calidad del embrión es un aspecto importante que refleja la eficiencia y desarrollo de los procesos embrionarios (Salgado Cruz & Lopera Vásquez, 2020).

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Materiales**

##### **3.1.1. Materiales Físicos y de Laboratorio**

- Termo para la recolección y transporte de ovarios
- Guantes
- Mascarillas
- Papel secante
- Jeringas 10 ml
- Termómetro
- Tijeras
- Envases de vidrio
- Papel aluminio
- Estufa triple gas (Memmert, IC050, Alemania)
- Estufa de CO<sub>2</sub> (Memmert, INC 108, Alemania)
- Cámara de Flujo Laminar
- Balanza de precisión (Boeco, Bas 31 plus, Alemania)
- Puntas de pipetas automáticas (blancas, amarillas, azules)
- Pipetas automáticas de 0 – 20 µl, 20 – 200 µl y de 200 – 1000 µl (Boeco®, Alemania)

- Microscopio de contraste de fases y fluorescencia (Nikon Eclipse Ci-E, contraste de fase negativo [Ph1] con filtro verde; Nikon Instruments, Inc., Nueva York).
- Microcentrífuga (Hettich, Mikro 200, Alemania)
- Sistema CASA, (Sperm Class Analyzer, SCA-Evolution® 2018, version 6.4.0, software. Microptic S.L., Barcelona, España).
- Osmómetro (Löser, typ 15, Alemania)
- Baño María (Memmert, W350, Alemania)
- Dispositivo de calentamiento (STC-3008, de elaboración artesanal, no patentado)
- Cajas cuadrículadas para búsqueda
- Cubre objetos largos
- Baño María
- Platina térmica
- Cámara de Trisgas
- Pinzas
- Guantes de nitrilo
- Tubos Falcón de 15 ml
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml
- Cajas Petri de 90
- Cajas nuck

### 3.1.2. Materiales biológicos

- Ovarios de vacas
- Espermatozoides de toro previamente congelados con y sin JR
- Espermatozoides de toro previamente vitrificados con y sin JR

### 3.1.3. Reactivos

- Medio de Maduración *in vitro* (MIV)
- Medio de Fecundación *in vitro* (FIV-TL-ST- $\mu$ MU)
- Medio de Cultivo *in vitro* (CIV-CR2)
- Medio de preparación de espermatozoides stock (Sperm- Talp)
- Percoll® (Sigma P1644)
- Nitrógeno líquido y gaseoso
- H-SOFT
- Lactato de Ringer Suplementado con PVA
- Cloruro de sodio (suero)

- Gentamicina 160/2ml

### 3.2. Metodología

#### 3.2.1. Área de estudio

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal ubicado en la Granja Irquis de la Universidad de Cuenca (Latitud: -3.0801834; Longitud: -79.0753254). Los ovarios bovinos fueron recolectados del camal municipal de la ciudad de Cuenca (empresa “EMURPLAG”), y fueron transportados al Laboratorio en suero fisiológico con gentamicina a una temperatura entre 35 – 37 °C en un lapso menor a 3 horas.

#### 3.2.2. Medios para la producción *in vitro* de embriones bovinos

La formulación de los medios de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* usados en este experimento están expuestos en las Tablas 1 – 4. Todos los diluyentes y medios se prepararon en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, utilizando productos químicos de grado reactivo adquiridos en Sigma-Aldrich Chemical Co.

**Tabla 1:** Medio de Maduración *in vitro* (MIV)

Reactivo	Concentración
TCM 199-Earle's salt	-
SFB	10% (v/v)
Piruvato de sodio	0,2 mM
FSH	25 µg/mL
LH	5 µg/mL
Gentamicina	50 µg/mL
L-glutamina	2 mM
Cisteamina	25 µM
Estradiol	2 µg/mL

**Tabla 2:** Medio de Fecundación *in vitro* (FIV-TL-ST-UMU)

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	114 mM

Cloruro de potasio	3,2 mM
Fosfato de sodio monobásico	0,3 mM
DL-Lactato de sodio	10 mM
Cloruro de calcio dihidratado	2 mM
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,5 mM
Bicarbonato de sodio	25 mM

---

### SUPLEMENTO DE MEDIO FIV

BSA	6 mg/mL
Piruvato de sodio	0,2 mM
Heparina	20 µg/mL
Gentamicina	50 g/mL

---

**Tabla 3:** Medio para la preparación de espermatozoides stock (Sperm-Talp)

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	100 mM
Cloruro de potasio	3,2 mM
Fosfato de sodio monobásico	0,3 mM
DL-Lactato de sodio	21,5 mM
Cloruro de calcio dihidratado	2 mM
Cloruro de magnesio hexahidratado	0,4 mM
HEPES acid free	10 mM
Bicarbonato de sodio	25 mM

---

### SUPLEMENTO DE MEDIO Sperm-Talp

BSA	6 mg/mL
Piruvato de sodio	1 mM
Gentamicina	50 g/mL

---

**Tabla 4:** Medio de cultivo in vitro (CIV-CR2)

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio	108 mM
Cloruro de potasio	3 mM

---

Bicarbonato de sodio	25 mM
L-Lactato de calcio hidrato	2,5 mM
Piruvato de sodio	4 mM
BME	X2
MEM	X1
Glutamina	0,02 mM
Estreptomina	0,1 mg/mL
Penicilina	100 U/mL

---

#### SUPLEMENTO DE MEDIO CIV-CR2

BSA	5 mg/mL
Alanina	1 mM
Glicina	1mM
SFB	3% (v/v)

---

### 3.2.3. Diseño experimental

Este estudio incluyó 4 tratamientos provenientes de semen bovino previamente congelado y vitrificado con 0,2% de JR:

- T1: Congelación convencional con JR (CC-JR, n= 80 pajuelas);
- T2: Congelación convencional sin JR, control (CC-Co, n=80 pajuelas);
- T3: Vitrificación con JR (VIT-JR, n=20 criotubos); y
- T4: Vitrificación sin JR, control (VIT-Co, n= 20 criotubos).

En una primera fase, se evaluó la cinemática mediante el sistema CASA de las muestras descongeladas y calentadas (SCA-Evolution 2018). En una segunda etapa, mediante FIV se evaluó la capacidad fecundante de los espermatozoides incluidos en los cuatro tratamientos. Se determinó el porcentaje de división celular (Clivaje), el desarrollo embrionario a los 7-8 días pos FIV mediante el crecimiento de blastocistos. Se realizó 11 sesiones de FIV y en cada grupo se fertilizó al menos 200 COC's madurados *in vitro*.

#### 3.2.3.1. Evaluación de la cinemática

Las muestras de semen bovino usadas en este estudio fueron criopreservadas por dos técnicas: congelación y vitrificación. El semen bovino fue diluido con TCG + 6% de yema de

huevo (YH). La congelación se realizó adicionando 5% de glicerol al diluyente y las pajuelas de 0,25 ml fueron expuestas a vapores de  $NL_2$  durante 10 minutos a una altura de 4 cm del nivel de  $NL_2$ . La descongelación de los tratamientos 1 y 2 (CC-JR, y CC-Co) se realizó sumergiendo las pajuelas en baño maría atemperado a 37°C durante 30 segundos. El contenido fue colocado en un tubo eppendorf de 1,5 ml e incubado durante 5 minutos previo al análisis de la cinemática.

La vitrificación previa fue realizada adicionando 100mM de sacarosa al diluyente y las muestras fueron sumergidas directamente al  $NL_2$  en gotas de 30  $\mu$ l. El calentamiento de los pellets mantenidos en criotubos de 2 ml de los tratamientos 3 y 4 de vitrificación (VIT-JR y VIT-Co) fue realizado exponiendo los pellets a unas platinas térmicas atemperadas a 63-65°C de un dispositivo de calentamiento artesanal (STC-3008, no patentado). Los pellets se derritieron entre 1 a 2 segundos y el contenido fue recolectado en un vaso de precipitación de 20 ml. Rápidamente estas muestras fueron trasladadas a un tubo eppendorf de 1,5 ml y centrifugadas a 300 gravedades durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue re-suspendido con TCG en el mismo volumen eliminado.

Se analizó la cinemática de las muestras descongeladas y calentadas en el sistema computarizado CASA-SCA® (Evolution, 2018, Microptic, Spain). Se registraron los siguientes parámetros según lo detallado por Galarza et al. (2018): motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidad rectilínea (VSL,  $\mu$ m/s), linealidad (LIN, %), rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu$ m), y frecuencia de batida del flagelo (Hz).

### 3.2.3.2. Evaluación de la capacidad fecundante

Esta evaluación se realizó en 11 sesiones de FIV usando al menos 200 ovocitos (aptos para fecundar) por cada tratamiento. Los ovarios bovinos recuperados del matadero fueron transportados al Laboratorio de Biotecnología en suero fisiológico (con gentamicina) a una temperatura entre 35 – 37°C en un lapso menor a 3 horas desde su sacrificio. La punción folicular, búsqueda y clasificación de ovocitos se realizó en el laboratorio. Los ovocitos clasificados como aptos para FIV (COC's con más de 3 capas de células de la granulosa, zona pelúcida intacta y el citoplasma homogéneo) fueron puestos a madurar *in vitro* (MIV) en grupos de 25 COC's colocados en microgotas de 60  $\mu$ L de medio MIV (Tabla 1) durante 24 horas en una Incubadora de CO<sub>2</sub> al 6% y humedad máxima.

Después de 24 horas de la MIV, los ovocitos fueron lavados dos veces en medio FIV (Tabla 2) y fueron transferidos a gotas de 60  $\mu$ L del mismo medio (FIV-TL-ST- $\mu$ MU) en grupos de 30 COC's por gota. Los espermatozoides descongelados y calentados de cada tratamiento (200  $\mu$ L) fueron seleccionados usando columnas de Percoll (400  $\mu$ L) de 45 y 90% dentro de un tubo Eppendorf de 1,5 ml y posteriormente centrifugados en una microcentrífuga a 500 gravedades durante 15 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en 1000  $\mu$ L de Sperm Talp (Tabla 3) y centrifugado por segunda vez (lavado) a 300 gravedades durante 5 minutos. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 60  $\mu$ L de Medio FIV y colocado en la incubadora de CO<sub>2</sub> durante al menos 30 minutos antes de la FIV. La concentración fue evaluada y cada muestra de cada tratamiento fue calculada para inseminar los ovocitos maduros de cada gota de 60  $\mu$ L a una concentración de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Los gametos (espermatozoides y óvulos) se incubaron conjuntamente a 38,5°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en aire con humedad máxima. Al menos 200 ovocitos madurados in vitro fueron inseminados con cada tratamiento en las 11 sesiones de FIV.

Al tercer día, los presuntos cigotos de cada gota y cada tratamiento fueron colocados en un tubo Falcón de 15 ml que contenía 2 ml de PBS atemperado a 38,5°C y fueron agitados en un vórtex a máxima potencia durante 3 minutos. Este procedimiento se realizó para eliminar las células de la granulosa y que los presuntos cigotos queden únicamente con su zona pelúcida. Los cigotos fueron nuevamente agrupados en 25 estructuras / gota 30  $\mu$ L de medio CIV (Tabla 4); previamente en estas placas de 35 mm se cubrió las gotas con 3 ml de aceite mineral. Estas placas fueron incubadas durante 8 días en una cámara triple gas (CO<sub>2</sub> 6%, Nitrógeno 5% y O<sub>2</sub>) a 38,5°C y una humedad máxima.

La interacción entre espermatozoides y ovocitos fue valorada en la capacidad que tuvieron los espermatozoides de los cuatro tratamientos para fecundar los ovocitos, y lograr una tasa de división celular (clivaje) a los 3 días; y lograr una tasa de blastocistos a los 8 días posterior a la FIV. Para calcular los porcentajes se dividió el número de estructuras divididas sobre el total de estructuras en cada gota y multiplicado por 100.

#### **3.2.4. Análisis estadísticos**

Los datos fueron analizados en el software STATISTICA v.12 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Las variables dependientes fueron sometidas a la prueba de Shapiro-Wilk para determinar una distribución normal; y aquellos datos que no siguieron una distribución normal fueron transformados a *Arcoseno* o *Log-10* (porcentuales y numéricos, respectivamente) previo a los análisis estadísticos. Un ANOVA factorial de 2 x 2 método de

criopreservación [*congelación y vitrificación*] y adición de jalea real (*JR y control*) y la prueba posHoc de Tukey fueron usados para evaluar el efecto JR en muestras congeladas y vitrificadas sobre la cinemática y capacidad fecundante. El nivel de significancia fue  $P < 0,05$ .



## 4. Resultados

### 4.1. Cinemática

Los resultados de la cinemática espermática de los cuatro tratamientos en estudio están expuestos en la Tabla 5. En general, las muestras congeladas y descongeladas mostraron una mayor cinemática que las muestras vitrificadas y calentadas. Los porcentajes de las motilidades total (MT) y progresiva (MP) de las muestras de los tratamientos de congelación (CC-JR y CC-Co) fueron más altos ( $P < 0,05$ ) que aquellas muestras de los tratamientos de vitrificación (VIT-JR y VIT-Co), independientemente de la adición de la JR. Sin embargo, las velocidades curvilíneas (VCL) y rectilínea (VSL) fueron mayores ( $P < 0,05$ ) con el tratamiento de congelación con JR (CC-JR) que todos los otros tratamientos (CC-Co, VIT-JR y VIT-Co). En las muestras de congelación la JR produjo un efecto potenciador de la locomoción debido a que incrementó ( $P < 0,05$ ) la VCL y VSL con respecto a su control (CC-JR vs. CC-Co). No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre tratamientos de ningún parámetro de relación de progresión (STR, LIN y WOB) y en la ALH. Finalmente, el valor de BCF fue mayor ( $P < 0,05$ ) con el tratamiento CC-JR que el resto de tratamientos; no obstante, la JR mostró un efecto benéfico en este parámetro cinético tanto en la congelación como en la vitrificación debido al incremento de sus valores en comparación con sus controles (CC-JR vs. CC-Co y VIT-JR vs. VIT-Co) (Tabla 5)

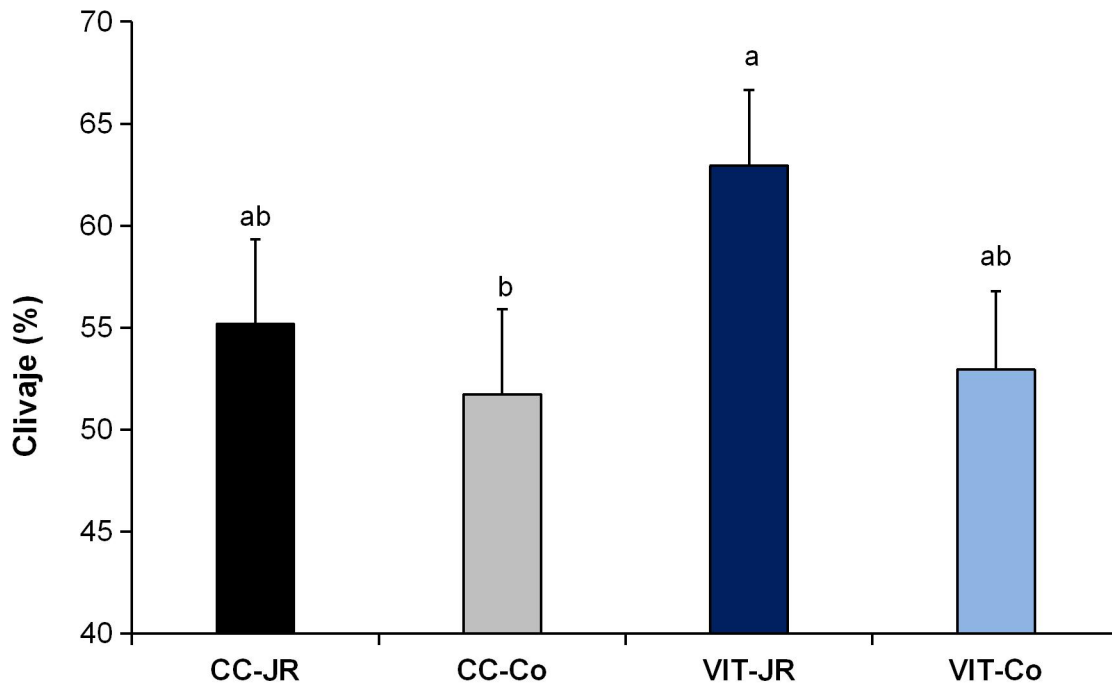
**Tabla 5** Parámetros cinemáticos de espermatozoides bovinos previamente congelados y vitrificados con jalea real.

Parámetros	Tratamientos			
	Post- descongelación		Post-calentamiento	
	CC-JR	CC-Co	VIT-JR	VIT-Co
MT (%)	33,4 ± 2,48 <sup>a</sup>	34,8 ± 2,60 <sup>a</sup>	13,4 ± 3,52 <sup>b</sup>	12,2 ± 1,80 <sup>b</sup>
MP (%)	16,0 ± 2,53 <sup>a</sup>	17,5 ± 2,65 <sup>a</sup>	8,2 ± 2,61 <sup>b</sup>	8,3 ± 1,49 <sup>b</sup>
VCL (µm/s)	84,1 ± 3,68 <sup>a</sup>	71,9 ± 4,44 <sup>b</sup>	61,5 ± 4,34 <sup>c</sup>	63,6 ± 6,44 <sup>c</sup>
VSL (µm/s)	30,8 ± 1,42 <sup>a</sup>	24,3 ± 1,51 <sup>b</sup>	21,1 ± 2,41 <sup>b</sup>	23,5 ± 2,33 <sup>b</sup>
STR (%)	64,4 ± 1,48	66,5 ± 1,01	64,8 ± 1,82	64,6 ± 0,75
LIN (%)	35,2 ± 1,17	37,8 ± 0,88	33,9 ± 1,85	36,6 ± 0,89
WOB (%)	52,9 ± 0,79	54,5 ± 0,71	51,1 ± 1,82	54,1 ± 1,1
ALH (µm)	3,3 ± 0,14	3,2 ± 0,17	2,8 ± 0,16	3,0 ± 0,27
BCF (HZ)	7,8 ± 0,35 <sup>a</sup>	6,7 ± 0,35 <sup>b</sup>	6,7 ± 0,50 <sup>b</sup>	5,4 ± 0,61 <sup>c</sup>

Diferentes superíndices en cada fila y cada parámetro expresan diferencias significativas entre tratamientos <sup>a-b-c</sup>  $P < 0,05$

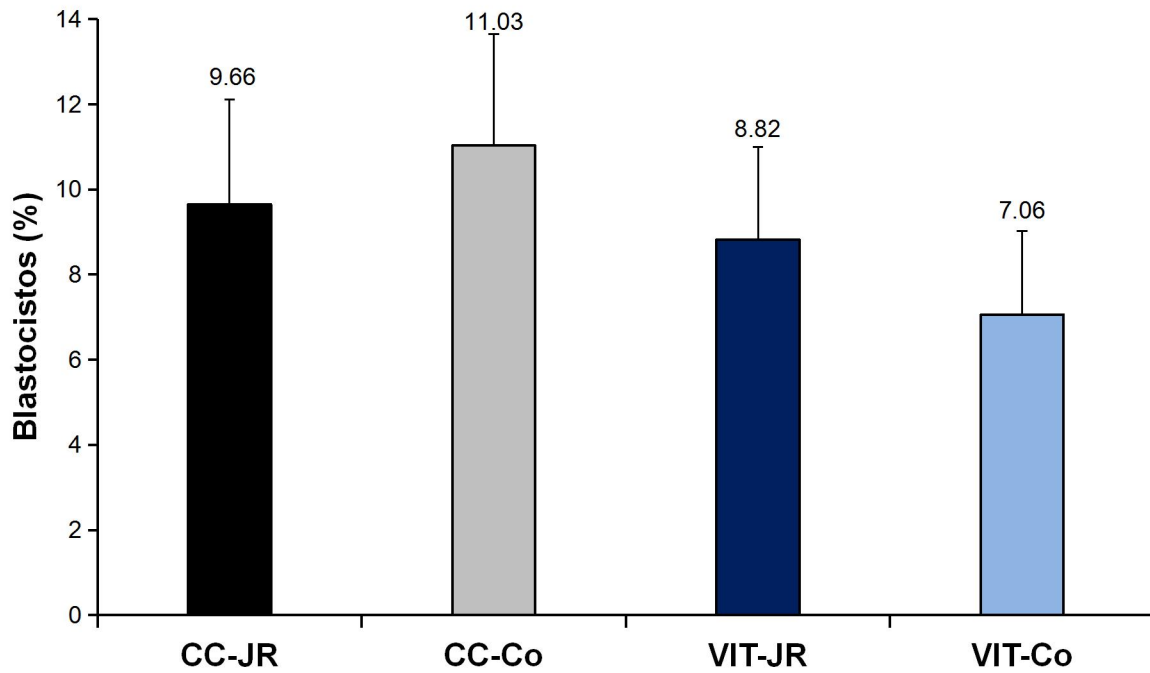
#### 4.2. Capacidad fecundante

El tratamiento VIT-JR produjo una tasa de división celular (equivalente al clivaje) más alta ( $P < 0,05$ ) que el tratamiento CC-Co ( $62,9 \pm 3,72\%$  vs. a  $51,7 \pm 4,16\%$ , respectivamente), no obstante, el tratamiento VIT-JR produjo un clivaje similar ( $P > 0,05$ ) a los otros dos tratamientos CC-JR y VIT-Co ( $55,2 \pm 4,14\%$  y  $52,9 \pm 3,84\%$ ).



**Figura N° 1** Tasa de división celular (clivaje) de ovocitos fecundados con espermatozoides bovinos congelados (CC-JR y CC-Co) y vitrificados (VIT-JR y VIT-Co) con y sin jalea real. Letras diferentes en cada barra y cada parámetro expresan diferencias significativas entre tratamientos (a – b,  $P < 0,05$ ).

No se evidenció diferencias significativas en la tasa de producción de blastocistos entre tratamientos ( $P > 0,05$ ). Respectivamente,  $9,7 \pm 2,46\%$ ;  $11,0 \pm 2,61\%$ ;  $8,8 \pm 2,18\%$ ; y  $7,1 \pm 1,97\%$  para CC-JR; CC-Co; VIT-JR y VIT-Co (Figura 2)



**Figura N° 2** Tasa de producción de blastocistos (desarrollo embrionario) proveniente de espermatozoides bovinos congelados (CC-JR y CC-Co) y vitrificados (VIT-JR y VIT-Co) con y sin jalea real y ovocitos bovinos madurados in vitro.

## 5. Discusión

Los resultados de la presente investigación, demuestran en general que los tratamientos de la congelación convencional con o sin JR produjeron una mejor criorespuesta que los tratamientos de vitrificación con y sin JR. No obstante, al comparar los tratamientos de la CC, la JR incrementó las velocidades curvilínea, rectilínea y la BCF; mientras que en la VIT, la JR únicamente incrementó la BCF. La fertilidad *in vitro*, sin embargo, aunque el clivaje fue superior en la vitrificación con JR, la tasa de blastocistos fue similar entre tratamientos. Estos resultados indican, que la JR y el método de vitrificación (con 100 mM en gotas de 30  $\mu$ L) resulta una combinación igual de útil que la congelación convencional, convirtiéndose en un método de criopreservación promisorio debido a su criorespuesta sobre la fertilidad. Es importante destacar que este trabajo constituye el primer reporte de la fertilidad *in vitro* lograda con espermatozoides bovinos vitrificados y calentados.

Los resultados obtenidos ayudan a evidenciar claramente que la adición del 0,2 % de JR a los medios de congelación y vitrificación proporciona un efecto positivo benéfico en algunos parámetros cinéticos de espermatozoides bovinos posteriores a la criopreservación. Anteriormente, Sabatini, (2009) mencionó que el incremento significativo de algunos parámetros cinéticos de espermatozoides puede deberse al alto contenido de carbohidratos que tiene la JR. Algunas investigaciones precursoras han demostrado que el efecto crioprotector de la JR se debe a la estructura química de las proteínas que incluyen aminoácidos esenciales que preservan la integridad de la membrana plasmática (Tamura et al., 2009). Otros autores sugieren que la JR posee una extraordinaria potencia antioxidante, capaz de eliminar los radicales libres, especialmente el anión superóxido (Nagai & Inoue, 2004).

Se ha sugerido que durante el proceso de criopreservación, ciertas proteínas y lípidos presentes en la JR se adhieren a la membrana plasmática protegiéndola de los cambios drásticos de la temperatura (Maghsoudlou et al., 2019). La protección de la membrana espermática por acción de la JR durante el proceso de congelación y descongelación probablemente esté asociada con la presencia de aminoácidos biológicamente activos como el ácido aspártico, cisteína, tirosina, glicina, lisina, leucina, valina y la isoleucina. Se ha especulado que la prolina modula las membranas celulares y demás estructuras de las proteínas contra las condiciones de estrés; y que la prolina y la cisteína funcionan como potentes antioxidantes que eliminan las ROS y sintetizan el glutatión durante el proceso de congelación. La naturaleza de la composición química de la JR, la presencia de aminoácidos esenciales (*ácido 10-hidroxi-2-decenoico*) y vitaminas (E y C) también contribuyen en la

protección de la membrana celular (Tamura et al., 2009). Sakhdary et al., (2022) también mencionan que la vitamina E y C que están presentes en gran cantidad en la JR actúan como potentes antioxidantes, reduciendo el daño que causan los radicales libres a las membranas espermáticas de los bovinos. Abd-Allah, (2012) sugieren que el elevado contenido de carbohidratos, vitaminas (E y C) y arginina que posee la JR (Moutsatsou et al., 2010), produce una mejor conservación de la calidad y longevidad de los espermatozoides bovinos en los procesos de criopreservación.

Otros autores han sugerido que los efectos de la JR sobre la calidad espermática y la capacidad fecundante pueden atribuirse a que ésta tiene estimulantes de la motilidad como la adenosina y el *N(1)-óxido* de Adenosin monofosfato (AMP), que mejoran la motilidad de los espermatozoides al inhibir AMPc (cíclico) a nivel de la cola del espermatozoide, en consecuencia, se estimula la fosforilación no solo de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), sino también de la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc/calcio (Fraser & Duncan, 1993; J. J Parrish et al., 1988; Vijayaraghavan & Hoskins, 1981). Nosotros creemos que esta fue la vía por el cual mejoró los valores de BCF después de ambos procesos de criopreservación (congelación – descongelación y vitrificación – calentamiento).

Trabajos realizados en la congelación y vitrificación de espermatozoides bovinos demostraron que el 0,2% de JR produce un mejoramiento de la cinemática del espermatozoide bovino congelado y vitrificado. Además, se demostró que la suplementación de 0,2% de JR ejerció un efecto crioprotector durante la vitrificación debido al incremento de la integridad de la membrana plasmática (Guanga et al., 2022; Galarza-Álvarez et al., 2022). Un trabajo realizado por (Shahzad et al., 2016) determinó que la concentración de 0,1% JR (frente a 0 [control]; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 y 0,4%) al medio de congelación (tris, ácido cítrico, fructosa, 20% yema de huevo y 7% glicerol) mejoró la criosupervivencia espermática y la capacidad de fertilización *in vitro* de los espermatozoides de búfalo. Estos autores indicaron que la tasa de clivaje fue significativamente mayor comparado con el grupo sin JR (60 % frente a 40 %), sin embargo, la tasa de preñez fue similar entre el grupo con 0,1% de JR y su control. Los resultados de la presente investigación son consistentes a los mencionados anteriormente, sin embargo, la fertilidad, a pesar de que el clivaje fue mayor con el tratamiento CC-JR en comparación con los otros tratamientos, la tasa de blastocistos fue significativamente similar.

La capacidad fecundante representada en el porcentaje de división celular de los espermatozoides bovinos fue más alto en el tratamiento VIT-JR en comparación con el tratamiento CC-Co, sin embargo los valores de VIT-JR fueron similares a los otros 2

tratamientos (CC-JR y VIT-Co). Anteriormente, se reportó que la suplementación con 0,4% de JR y 10 µg/ml heparina fue efectivo para inducir la reacción del acrosoma y mejorar la capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides de búfalo criopreservados (Abd-Allah, 2012). La JR contiene calcio, y en presencia de heparina mejora el proceso de capacitación. Otro trabajo realizado por (El-Sherbiny, 2013) sugirió que la adición con JR (0 como [control] 10, 20, 30, 40, 50 and 100 mg / 6 ml) al diluyente TCG (Tris, ácido cítrico, glucosa, DMSO, 18% yema de huevo y 2% miel de abeja) mejoró la motilidad, la viabilidad y las anomalías morfológicas de los espermatozoides de conejo posterior a la descongelación. No obstante, los autores determinaron que la fertilidad (*in vitro*) dependió de la concentración de JR; altas concentraciones de JR produjeron un efecto negativo sobre la calidad del semen o la capacidad fecundante. Por otro lado, se ha determinado que la JR administrada por vía oral (100 mg/kg de peso corporal) tiene efectos protectores sobre ADN espermático y mejora el desarrollo embrionario temprano *in vitro* (tasa de clivaje y blastocistos) en ratas tratadas con ofloxacina (Ebadimanas, 2019). El presente trabajo de investigación usó diluyente TCG + 6% yema de huevo + 5% glicerol suplementado con 0,2% de JR y posterior a la descongelación y antes de la FIV, los espermatozoides fueron expuestos a 10 µg/ml de heparina, por lo que creemos que este proceso ayudó a la capacitación espermática, y consecuentemente, a una mayor penetración y división celular (clivaje) según los porcentajes mayores (numéricamente o significativamente) de los grupos con JR.

### Conclusiones

Esta investigación concluye que la jalea real incrementó las velocidades curvilínea y rectilínea y la frecuencia de batida de flagelo de los espermatozoides bovinos posterior al proceso de congelación y descongelación; mientras que posterior a los procesos de vitrificación y calentamiento, la jalea real mejoró únicamente la frecuencia de batida de flagelo. La fertilidad *in vitro*, sin embargo, no tuvo efecto significativo produciendo una tasa de blastocistos similar entre tratamientos de congelación y vitrificación con o sin jalea real.

## Referencias

- Abd-Allah. (2012). Effect of Royal Jelly on the Fertilizing Ability of Buffalo Spermatozoa In Vitro. *Journal of Buffalo Science*, 1(1), 1–4. <https://doi.org/10.6000/1927-520x.2012.01.01.01>
- Abd-Allah, S. M. (2010). Effect of royal jelly on bovine sperm characteristics during post-thaw incubation in vitro. *Revista Veterinaria*, 21(2), 81–85. <https://doi.org/10.30972/vet.2121747>
- Alcay, S., Toker, M. B., Onder, N. T., & Gokce, E. (2017). Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. *Cryobiology*, 74, 81–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.011>
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17.e3. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Amini, S., Masoumi, R., Rostami, B., Shahir, M. H., Taghilou, P., & Arslan, H. O. (2019). Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. *Cryobiology*, 88, 75–80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.008>
- Anil, S., Dosler, S., & Mericli, A. H. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of *Verbascum caesareum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 52(1), 125–126. <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1566-y>
- Anzar, M., Kroetsch, T., & Buhr, M. M. (2009). Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. *Journal of Andrology*, 30(6), 661–668. <https://doi.org/10.2164/jandrol.108.007500>
- Arav, A., Yavin, S., Zeron, Y., Natan, D., Dekel, I., & Gacitua, H. (2002). New trend in gamete cryopreservation New trends in gamete ' s cryopreservation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(March 2002), 77–81.
- Arias, M. E., Andara, K., Briones, E., & Felmer, R. (2017). Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology*, 17(2), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.03.002>
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Minireview: Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1), 1–7.
- Baumber, J., Ball, B. A., & Linfor, J. J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, 66(5), 772–779.
- Carrell, D. T., & Aston, K. I. (2013). *Methods in Molecular Biology™ Spermatogenesis Methods and Protocols*.
- Celeghini, E. C. C., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Nascimento, J., Raphael, C. F., & Rodrigues, P. H. M. (2008). Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, 104(2–4), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.001>



- Chian, R. ., Okuda, K., & Niwa, K. (1995). Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. *Animal Reproduction Science*, 38(1–2), 37–48. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01357-R](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01357-R)
- Cormier, N., Sirard, M.-A., & Bailey, J. L. (1997). Premature Capacitation of Bovine Spermatozoa Is Initiated by Cryopreservation. *Journal of Andrology*, 18(4), 461–468.
- Dittrich, W., & Göhde, W. (1973). *Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium*. 1–6. <https://www.google.com/patents/US3761187>
- Ebadimanas, G. (2019). Protective effect of royal jelly on the DNA integrity of sperms and early in vitro embryonic development in ofloxacin treated rats. *Comparative Clinical Pathology*, 28(2), 541–547. <https://doi.org/10.1007/s00580-018-2832-0>
- El-Sherbiny, A. (2013). Effect of royal jelly in honey-included egg yolk based extenders on motility, viability and fertilizing ability of frozen rabbit spermatozoa. *Egyptian Journal of Rabbit Science*, 23(2), 149–160. <https://doi.org/10.21608/ejrs.2013.54261>
- Farin, P. W., Moore, K., & Drost, M. (2006). Assisted Reproductive Technologies in Cattle. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology: Second Edition, June 2022*, 496–508. <https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50066-0>
- Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., & Foote, R. H. (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Elsevier*, 49(4), 871–879.
- Feitsma, H., Broekhuijse, M. L. W. J., & Gadella, B. M. (2011). Do CASA systems satisfy consumers demands? A critical analysis. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(SUPPL. 2), 49–51. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01867.x>
- Forero-Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F., & Arruda, R. P. (2012). Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 44(SUPPL.1), 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01154.x>
- Fraser, L. R., & Duncan, A. E. (1993). Adenosine analogues. *J. Reprod. Fertil.*, 187–194.
- Gacitua, H., & Arav, A. (2005). Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology*, 63(3), 697–972.
- 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>
- Galli, A., Basetti, M., Balduzzi, D., Martignoni, M., Bornaghi, V., & Maffii, M. (1991). Frozen bovine semen quality and bovine cervical mucus penetration test. *Theriogenology*, 35(4), 837–844. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90424-C](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90424-C)
- García-Herreros, M., & Leal, C. L. V. (2014). Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60(6), 338–347. <https://doi.org/10.3109/19396368.2014.938279>
- Garner, D. L., Pinkel, D., Johnson, L. A., & Pace, M. M. (1986). Assessment of spermatozoal

- function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, 34(1), 127–138. <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.1.127>
- Gautam, A., Masashige, K., & Goral, G. (2015). *Vitrification in Assisted Reproduction* (Springer I). Springer New Delhi. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-81-322-1527-1>
- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos* (2nd ed.). CABI Publishing.
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Guanga, J., Lucero, J., Samaniego, X., Segarra, E., Galarza-Álvarez, L., & Galarza, D. A. (2022). La suplementación de jalea real a diluyente de base sintética y no sintética ayuda a mantener la motilidad y cinética de esperma de toro refrigerado. *Spermova*, 12(1), 170–171. <https://doi.org/10.18548/aspe/0010.22>
- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., & Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52(4), 683–700. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4)
- Howe, S. R., Dimick, P. S., & Benton, A. W. (1985). Composition of Freshly Harvested and Commercial Royal Jelly. *Journal of Apicultural Research*, 24(1), 52–61. <https://doi.org/10.1080/00218839.1985.11100649>
- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S., & Nawroth, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: From past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), 191–200. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61710-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61710-5)
- Januskauskas, A., Gil, J., Soderquist, Haard, M., Haard, Mc., Johannisson, A., & Rodríguez-Martínez, H. (1999). Capacitation Status and Fertility of Dairy Bull Semen Used for Artificial. *Theriogenology*, 52(99), 641–658.
- Jeyendran, R. S., & Graham, E. F. (1980). An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa. *Elsevier*, 17(5), 450–464.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., & Kadirvel, G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review. *Reprod. Domest. Anim.*, 46(1), 165–172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>
- Katila, T. (2001). In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42(2), 199–217.
- Kefer, J. C., Agarwal, A., & Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, 16(5), 449–457. <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2009.02280.x>
- Larsen, W., Wert, S., Chen, L., Russell, P., & Hendrix, E. (1991). Expansion of the cumulus-oocyte complex during the preovulatory period: possible roles in oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Springer*, 45–61.
- Lenz, R. W., Ball, G. D., Leibfried, M. L., Ax, R. L., & First, N. L. (1983). In vitro maturation

- and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biology of Reproduction*, 29(1), 173–179. <https://doi.org/10.1095/biolreprod29.1.173>
- Maddox-Hyttel, P., Gjørret, J., Vajta, G., Alexopoulos, N., Lewis, I., Trounson, A., Viuff, D., Laurincik, J., Müller, M., Tveden-Nyborg, P., & Thomsen, P. (2019). Morphological assessment of preimplantation embryo quality in cattle. *Bioscientifica Proceedings*. <https://doi.org/10.1530/biosciprocs.5.009>
- Maghsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mohebodini, H., & Toldra, F. (2019). Royal Jelly: Chemistry, Storage and Bioactivities. *Journal of Apicultural Research*.
- Majeed, H. N., Saad S, A.-D., Sabah N, A., & Mena W, H. (2015). Effect of Royal Jelly on Epididymal Sperms Characters in Vasectomized. *Elsevier*, 5(4), 13.
- Mastromonaco, G., Semple, E., Robert, C., Rho, G., Betts, D., & King, W. (2004). Different Culture Media Requirements of IVF and Nuclear Transfer Bovine Embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(6), 462–467. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00548.x>
- Mohanty, T., Lone, S., Kumaresan, A., Bhakat, M., Kumar, R., Baithalu, R., Sinha, R., Paray, A., Yadav, H., Sahu, S., & Mohanty, A. (2018). Sperm dosage and site of insemination in relation to fertility in bovines. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.220977>
- 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>
- Mortimer, S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*, 3(5), 403–439. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.5.403>
- Mortimer, S. T. (2000). CASA — Practical Aspects Andrology Lab Corner. *Journal of Andrology*, 21, 515–524.
- Moutsatsou, P., Papoutsis, 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), e15594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015594>
- Nagai, T., & Inoue, R. (2004). Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*, 84(2), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00198-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00198-5)
- Olfati Karaji, R., Daghigh Kia, H., & Ashrafi, I. (2014). Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze–thaw bull sperm. *Cell Tissue Bank*, 15, 461–470.
- Oliveira, L. Z., Arruda, R. P., Celeghini, E. C. C., de Andrade, A. F. C., Perini, A. P., Resende, M. V., Miguel, M. C. V., Lucio, A. C., & Hossepian de Lima, V. F. M. (2012). Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia*, 44(1), 9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01096.x>
- Palasz, A. T., Rodriguez-Martinez, H., Beltran-Breña, P., Perez-Garnelo, S., Martinez, M. F.,

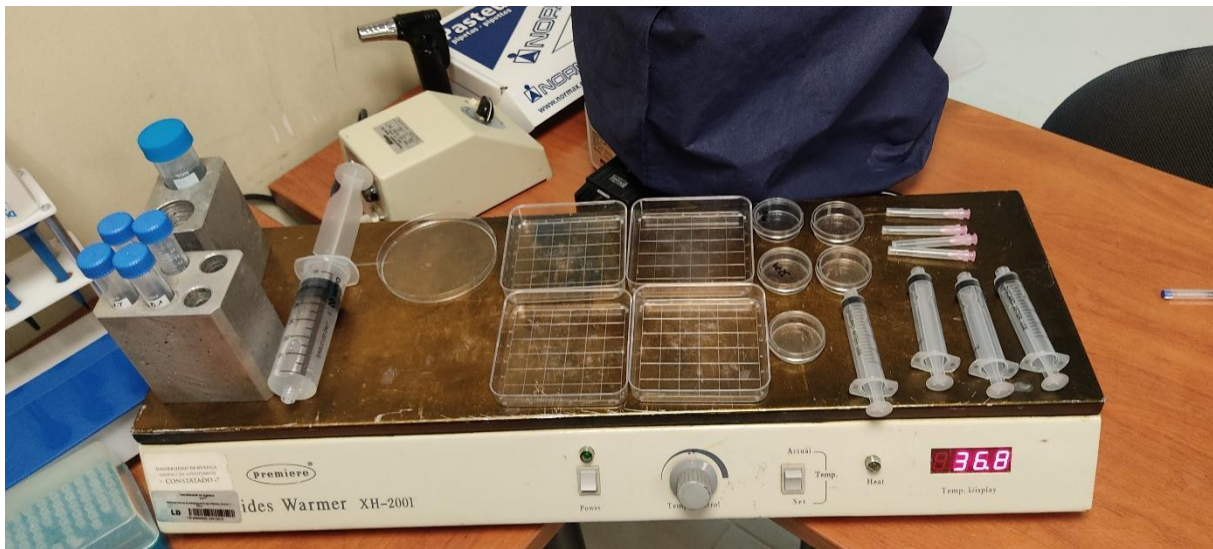
- Gutierrez-Adan, A., & De la Fuente, J. (2006). Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo in vitro development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Molecular Reproduction and Development*, 73(12), 1503–1511. <https://doi.org/10.1002/mrd.20516>
- Palomo, M. ., Izquierdo, D., Mogas, T., & Paramio, M. . (1999). Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 51(5), 927–940. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00039-4)
- Parrish, J. J, Susko-Parrish, J., Winer, M. A., & First, N. I. (1988). Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. *Biology of Reproduction*, 38(5), 1171–1180. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- Parrish, John J. (2014). Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*, 81(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>
- Peláez, V. (2011). *Producción in vitro de Embriones Bovinos* [Universidad de Cuenca]. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Phillips, P. H., & Lardy, H. A. (1940). A Yolk-Buffer Pabulum for the Preservation of Bull Semen. *Journal of Dairy Science*, 23(5), 399–404. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(40\)95541-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(40)95541-2)
- Pickett, B. W., Berndtson, W. E., & Sullivan, J. J. (1978). Influence of seminal additives and packaging systems on fertility of frozen bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 47 Suppl 2(February 1978), 12–47.
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. In *Nature* (Vol. 164, p. 666).
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., & Nizanski, W. (2012). Computer-Assisted sperm analysis in dogs and cats: An Update after 20 Years. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL. 6), 204–207. <https://doi.org/10.1111/rda.12057>
- Rodríguez-Martínez, H. (2006). Can We Increase the Estimative Value of Semen Assessment? *Reproduction in Domestic Animals*, 41(s2), 2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00764.x>
- Rodríguez, M., & Nivia, A. (2017). Efecto de la adición de antioxidantes sobre la motilidad espermática post-criopreservación y fertilidad del semen de peces. *Revista Veterinaria*, 28(2), 157–164. <https://doi.org/10.30972/vet.2822544>
- Sabatini, A. G. (2009). Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1), 16–21. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.1.04>
- Said, T., Gaglani, A., & Agarwal, A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online*, 21, 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.011>
- Sakhday, H., Farshad, A., Rostamzadeh, J., Binabaj, F., & Sobhani, K. (2022). Effects of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in diluents on cryopreserved bull epididymal sperm. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 11(1), 44. <https://doi.org/10.4103/2305-0500.335861>
- Salgado Cruz, E., & Lopera Vásquez, R. (2020). Essential aspects on in vitro fertilization techniques in cattle. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 31(3), 1–14.

<https://doi.org/10.15381/RIVEP.V31I3.17138>

- Salisbury, G. W., Beck, G. H., Elliott, I., & Willett, E. L. (1943). Rapid Methods for Estimating the Number of Spermatozoa in Bull Semen. *Journal of Dairy Science*, 26(1), 69–78. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(43\)92695-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(43)92695-5)
- Salisbury, G. W., Fuller, H. K., & Willett, E. L. (1941). Preservation of Bovine Spermatozoa in Yolk-Citrate Diluent and Field Results from its Use. *Journal of Dairy Science*, 24(11), 905–910. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(41\)95476-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(41)95476-0)
- Samardzija, M., Karadjole, M., Matkovic, M., Cergolj, M., Getz, I., Dobranic, T., Tomaskovic, A., Petric, J., Surina, J., Grizelj, J., & Karadjole, T. (2006). A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Animal Reproduction Science*, 91(3–4), 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.005>
- Sanbuissho, A., & Threlfall, W. R. (1990). The influence of serum and gonadotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 34(2), 341–348. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90527-Z](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90527-Z)
- Saragusty, J., Gacitua, H., Rozenboim, I., & Arav, A. (2009). Protective effects of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 71(9), 1425–1432.
- Serhat, B., Pürhan, B. T., Mustafa, N. B., Ayşe, E., Serpil, S., Umut, T., & Burcu, Ü. E. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*, 150(3–4), 77–83.
- Shahzad, Q., Mehmood, M. U., Khan, H., Husna, A., 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.
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2016). Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Elsevier*, 169, 2–5.
- Smetanina, I., Tatarinova, L., & Krivokharchenko, A. (2014). Effects of hormones on in vitro maturation of cattle oocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 157, 634–636. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2632-8>
- Soler, C., Valverde, A., Bompard, D., Fereidounfar, S., Sancho, M., Yániz, J. L., Garcia-Molina, A., & Korneenko-Zhilyaev, Y. A. (2017). New methods of semen analysis by casa. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 52(2), 232–241. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.2.232eng>
- Stival, C., Puga Molina, L. del C., Paudel, B., Buffone, M. G., Visconti, P. E., & Krapf, D. (2016). Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Sperm. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 220, 93–106. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7_5)
- Tamura, S., Kono, T., Harada, C., Yamaguchi, K., & Moriyama, T. (2009). Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis mellifera*. *Food Chemistry*, 114(4), 1491–1497. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.058>
- Van Soom, A., Mateusen, B., Leroy, J., & de Kruif, A. (2003). Assessment of mammalian embryo quality: what can we learn from embryo morphology? *Reproductive BioMedicine Online*, 7(6), 664–670. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62089-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62089-5)

- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Elsevier, 01*, 149–170.
- Vijayaraghavan, S., & Hoskins, D. (1981). Regulation of bovine sperm. *Biol. Reprod.*, *34*, 468–477.
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, *7*, 871–891.
- White, I. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, *5*, 639–658.
- Witt, K. D., Beresford, L., Bhattacharya, S., Brian, K., Coomarasamy, A., Hooper, R., Kirkman-Brown, J., Khalaf, Y., Lewis, S. E., Pacey, A., Pavitt, S., West, R., & Miller, D. (2016). Hyaluronic Acid Binding Sperm Selection for assisted reproduction treatment (HABSelect): study protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open*, *6*(10), e012609. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-012609>
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2021). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
- Yang, B. K., Yang, X., & Foote, R. H. (1994). Early Development of IVM/IVF Bovine Embryos Cultured with or without Somatic Cells in a Simple Serum-free Medium with Different Concentrations of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. *Journal of Reproduction and Development*, *40*(3), 197–205. <https://doi.org/10.1262/jrd.40.197>
- Zheng, H. Q., Hu, F. L., & Dietemann, V. (2011). Changes in composition of royal jelly harvested at different times: Consequences for quality standards. *Apidologie*, *42*(1), 39–47. <https://doi.org/10.1051/apido/2010033>

Anexos



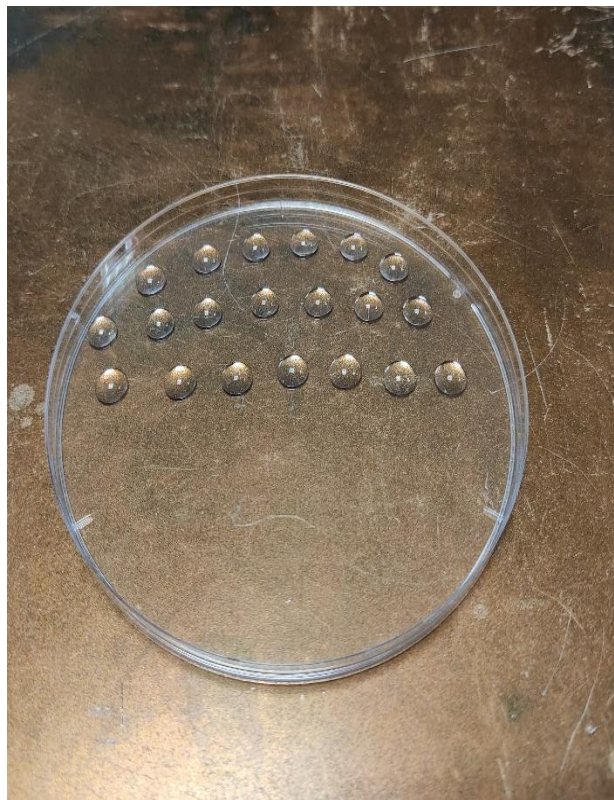
**Anexo A.** Preparación de materiales para la aspiración y selección de COC's



**Anexo B.** Punción y aspiración de folículos.

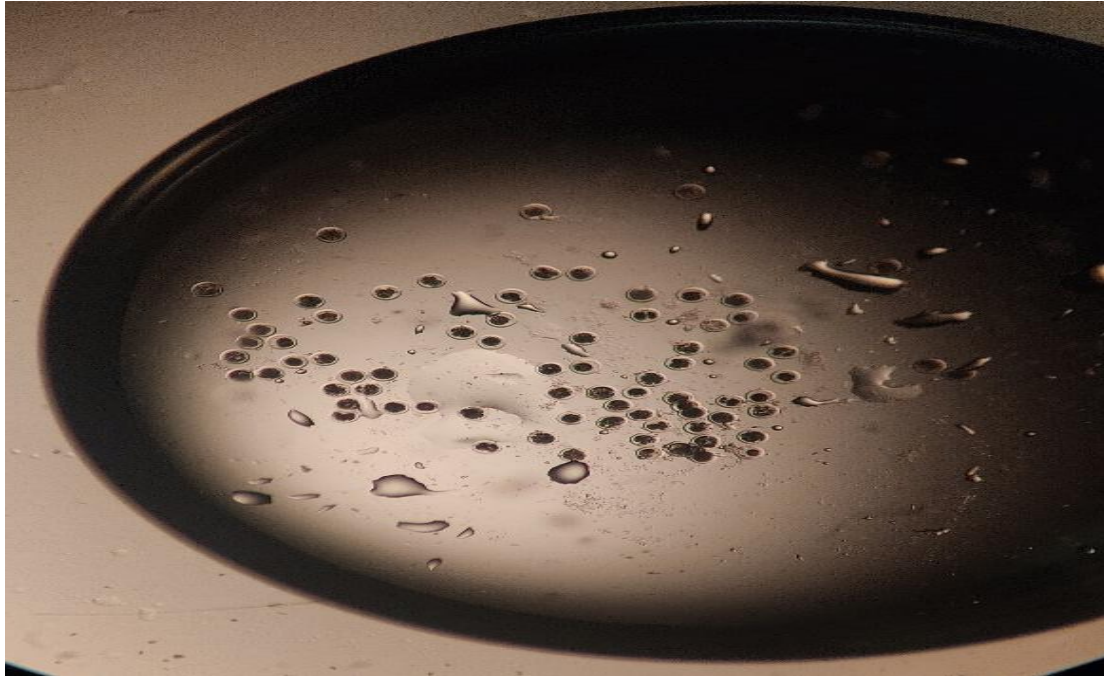


**Anexo C.** Búsqueda y clasificación de COC's



**Anexo D.** Gotas de 60ul para el lavado de COC's

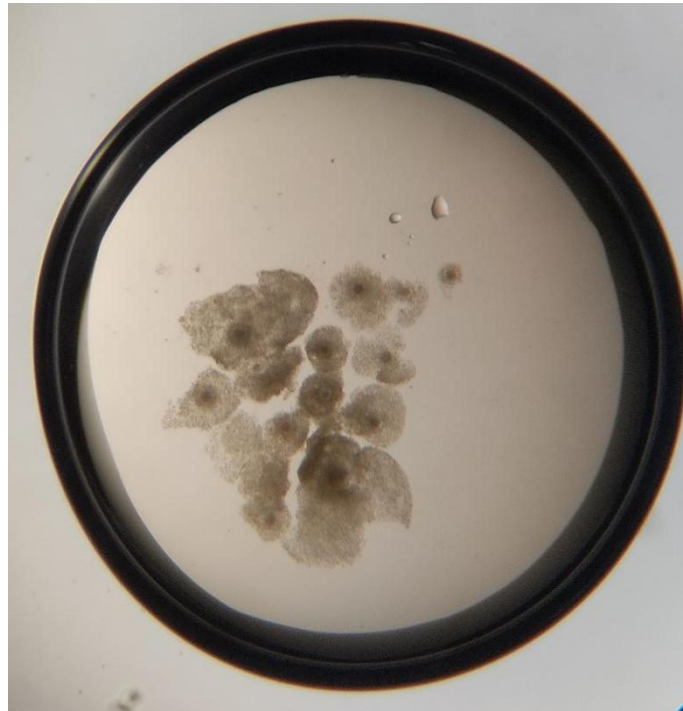




**Anexo E. Clasificación de COC's**



**Anexo F. Materiales para realizar el calentamiento de pellets**



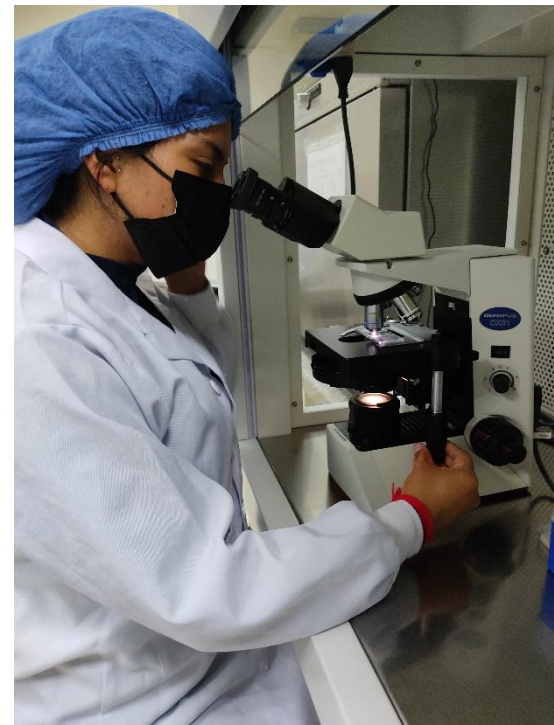
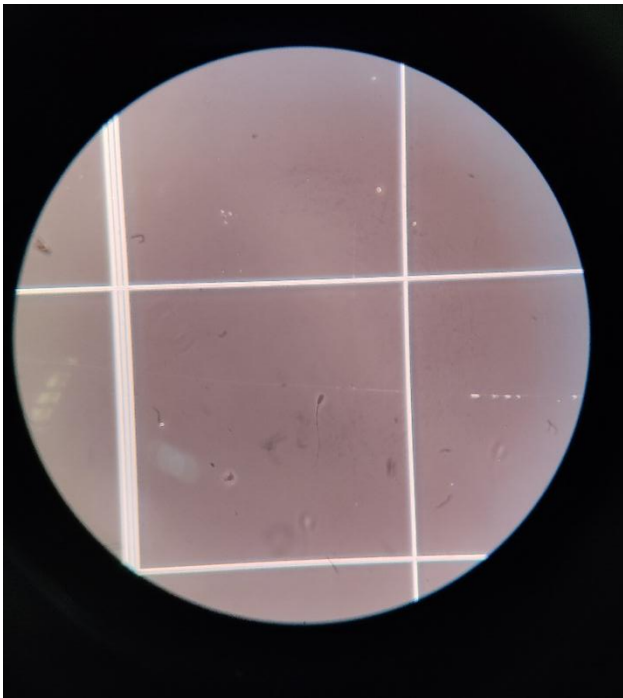
**Anexo G.** Maduración de COC's



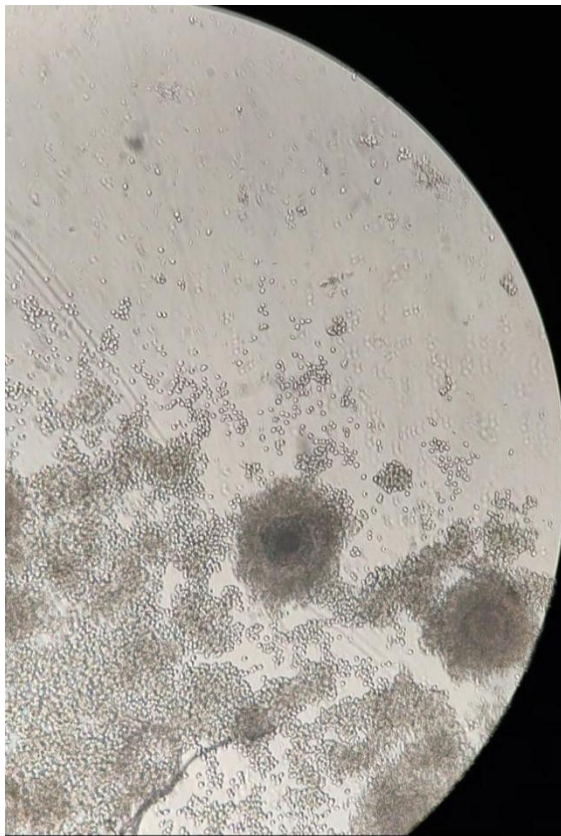
**Anexo H.** Elaboración de columnas de Percoll



**Anexo I.** Preparación de la cámara de Neubauer



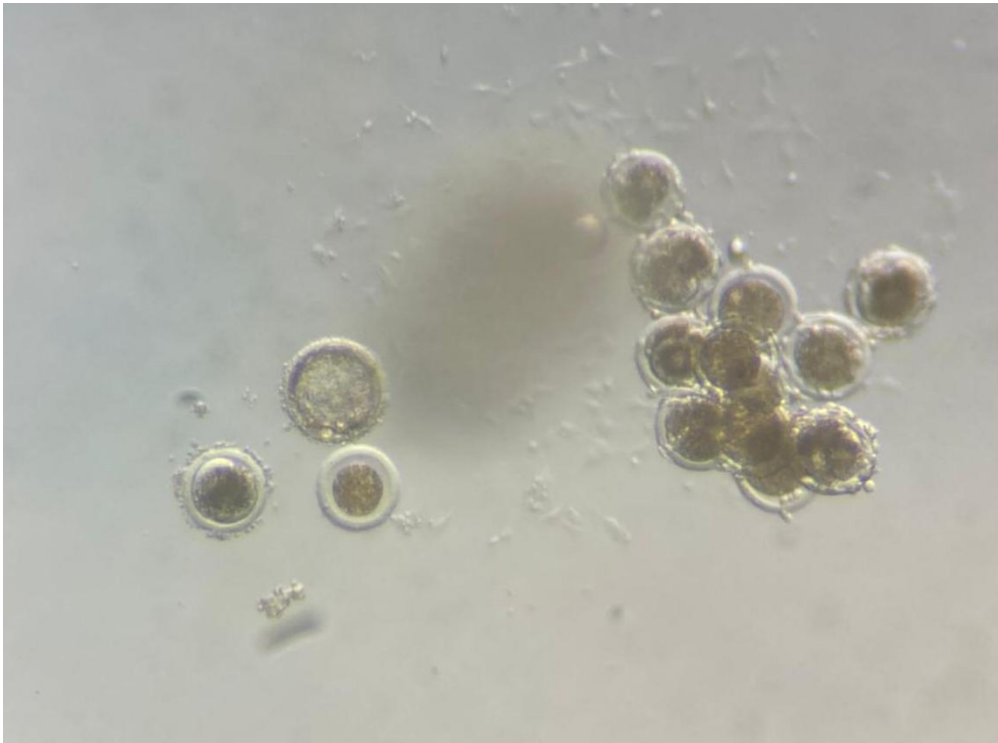
**Anexo J.** Conteo de espermatozoides



**Anexo K.** Inseminación in vitro



**Anexo L.** Presuntos cigotos en un tubo Falcón agitados en un vórtex



**Anexo M.** Presencia de blastocistos al día 4, realizado con espermatozoides vitrificados