



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN
Y SERVICIO EN ZOOTECNIA
POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

COMPORTAMIENTO SEXUAL, CALIDAD SEMINAL
Y POTENCIAL REPRODUCTIVO EN CONEJOS
SUPLEMENTADOS CON POLIFENOLES DE TÉ VERDE

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

ROCÍO MENTADO AMIGÓN

Bajo la supervisión de: **Raymundo Rodríguez De Lara, Ph.D.**



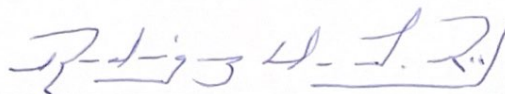
Chapingo, Estado de México, junio de 2022

**COMPORTAMIENTO SEXUAL, CALIDAD SEMINAL Y
POTENCIAL REPRODUCTIVO EN CONEJOS SUPLEMENTADOS
CON POLIFENOLES DE TÉ VERDE**

Tesis realizada por **ROCÍO MENTADO AMIGÓN**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

DIRECTOR:



Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara

ASESOR:



Dra. Marianella Fallas López

ASESOR:



Ph.D. Rodolfo Ramírez Valverde

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE APÉNDICES	vi
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DATOS BIOGRÁFICOS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Literatura citada	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Radicales libres y estrés oxidativo	3
2.2. Sistemas antioxidantes	4
2.3. Flavonoides como antioxidantes y pro oxidantes	4
2.4. Té verde (<i>Camellia sinensis</i>)	6
2.5. Características generales del sistema reproductivo del conejo adulto ..	8
2.6. Evaluación seminal.....	9
2.6.1. Evaluación convencional.....	9
2.6.2. Sistema de análisis seminal asistido por computadora (CASA)	9
2.7. Literatura citada	13
3. COMPORTAMIENTO SEXUAL, CALIDAD SEMINAL Y POTENCIAL REPRODUCTIVO EN CONEJOS SUPLEMENTADOS CON POLIFENOLES DE TÉ VERDE	18
RESUMEN GENERAL.....	19
GENERAL ABSTRACT.....	20
3.1. Introducción	21
3.2. Materiales y métodos.....	22
3.2.1. Localización	22
3.2.2. Animales, tratamientos y diseño experimental	22
3.2.3. Instalaciones	22

3.2.4.	Manejo alimenticio	23
3.2.5.	Manejo y administración de los extractos de té verde	23
3.2.6.	Colección de semen y variables de respuesta	24
3.2.7.	Análisis estadístico	25
3.3.	Resultados y discusión	26
3.3.1.	Comportamiento sexual, características seminales y producción espermática.....	30
3.3.3.	Características de motilidad y cinemática de movimiento espermático.....	34
3.3.4.	Morfología espermática y potencial reproductivo	40
3.4.	Conclusiones	42
3.5.	Literatura citada	44
4.	APÉNDICES	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Nominación y descripción de variables consideradas en el presente estudio	10
Cuadro 2. Estadísticos descriptivos y coeficientes de variación para peso de los machos, comportamiento sexual, calidad seminal, movimiento y cinemática espermática en conejos.	27
Cuadro 3. Estadísticos descriptivos y coeficientes de variación para normalidad espermática, morfología, concentración de espermatozoides normales motiles progresivos y dosis potenciales para inseminación artificial en conejos.....	28
Cuadro 4. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de tratamiento y orden de eyaculado en el comportamiento sexual, características seminales y producción espermática en conejos.....	31
Cuadro 5. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de interacción entre tratamiento y orden de eyaculado en el volumen seminal en conejos.	34
Cuadro 6. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para el efecto de tratamiento y orden de eyaculado en las características de movilidad y de cinemática de movimiento espermático en conejos.....	35
Cuadro 7. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para el efecto de tratamiento y orden de eyaculado en la morfología espermática y potencial reproductivo en conejos Nueva Zelanda Blanco.....	40

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1. Configuración del sistema CASA	51
Apéndice 2. Configuración sistema CASA para cinemática de movimiento espermática	52

DEDICATORIA

A mi madre, que me inculcó el respeto y amor por los seres vivos.

A Guillermo Samuel, quien me ha impulsado cada día en mi desarrollo profesional y personal, gracias por tu apoyo y amor incondicional.

A Leonor, quien me motiva a ser la mejor versión de mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento para llevar a cabo mis estudios en la Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Posgrado en Producción Animal por brindarme la oportunidad y el apoyo para desarrollarme profesionalmente en su programa de posgrado.

A “Conejos” Centro de Investigación Científica del Estado de México A. C. (COCICEMAC), por abrirme sus puertas.

Al Ph.D. Raymundo Rodríguez De Lara, por su gran apoyo, empeño y guía en el desarrollo de este trabajo de investigación y mi estancia en esta institución.

A la Dra. Marianella Fallas López por su paciencia y asesoría en el desarrollo del trabajo de investigación.

Al Ph.D. Rodolfo Ramírez Valverde por su apoyo en la elaboración del trabajo de tesis.

A la Ingeniero en Alimentos Catalina Islas Caballero por su disposición y apoyo para facilitar el extracto de té verde empleado en esta investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Rocío Mentado Amigón
Fecha de nacimiento	17 de octubre de 1991
Lugar de nacimiento	Puebla, Pue.
CURP	MXAR911017MPLNMC09
Profesión	Médico Veterinario Zootecnista
Cédula profesional	10972786

Desarrollo académico

2020-2021	Maestría en Innovación Ganadera. Universidad Autónoma Chapingo
2010-2015	Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En conejos bajo monta natural pueden presentarse detrimentos en la calidad seminal, particularmente en estaciones críticas del año, disminuyendo la eficiencia reproductiva, y afectando los ingresos y la rentabilidad de granjas cunícolas (Cruz-Bacab, Ramírez-Vera, Vázquez-García, & Zapata-Campos, 2018).

Una de las causas asociadas con esta merma es la sobreproducción de radicales libres, los cuales son moléculas altamente reactivas con uno o más electrones impares que desestabilizan la molécula más cercana, lo que genera una reacción en cascada (Agarwal, Abdelrazik, & Sharma, 2008). Entre los radicales libres podemos encontrar las especies reactivas de oxígeno, las cuales oxidan la membrana celular del espermatozoide, dañando el ADN y reduciendo su capacidad fertilizante (Hashem, El-Hady, & Hassan, 2013; Yousef, Abdallah, & Kamel, 2003). Para prevenir dicha oxidación se han investigado los metabolitos y extractos derivados de plantas (también conocidos como fitogénicos), ya que se ha reportado que disminuyen los radicales libres, directa o indirectamente, regulando las enzimas antioxidantes (Zanchi et al., 2015).

Una de las plantas que ha recibido mayor atención en el campo científico, debido a sus fuertes propiedades antioxidantes derivadas de su contenido de polifenoles, es el té verde (*Camellia sinensis*) (Cabrera, Giménez, & López, 2003; El-Ratel, Abdel-Khal, El-Hairiry, Fouda, & El-Bnaw, 2017).

Existe escasa información en conejos sobre los efectos del té verde, aunque en otras especies, como en las ratas, ha mostrado disminuir el daño de la membrana espermática en animales expuestos a diversas dosis de nicotina (Mosbah, Yousef, & Mantovani, 2015).

El Capítulo 2 presenta una revisión de literatura, donde se describen los procesos fisiológicos y patológicos asociados con los radicales libres. Se mencionan las

funciones anti oxidativas del té verde en función de su contenido de polifenoles, así como los parámetros seminales del conejo.

El Capítulo 3 expone el artículo científico derivado de la fase experimental, donde se discuten las características seminales y el comportamiento sexual obtenido bajo la suplementación de extracto de té verde.

1.1. Literatura citada

- Agarwal, A., Abdelrazik, H., & Sharma, R. K. (2008). Oxidative stress management in patients with male or female factor infertility. *Handbook of Chemiluminiscent Methods in Oxidative Stress Assessment*. 195.
- Cabrera, C., Giménez, R., & López, M. C. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4427- 4435. doi:10.1021/jf0300801
- Cruz-Bacab, L. E, Ramírez-Vera, S., Vázquez-García, M. C, & Zapata-Campos, C. C. (2018). Reproducción de conejos bajo condiciones tropicales, efectos negativos y posibles soluciones. *CienciaUAT*, 13(1), 135-145. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.989>
- El-Ratel, I., Abdel-Khal, A., El-Harairy, M., Fouda, S. F., & El-Bnaw, L. Y. (2017). Impact of green tea extract on reproductive performance, hematology, lipid metabolism and histogenesis of liver and kidney of rabbit does. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(2), 51-60. <https://doi.org/10.3923/ajava.2017.51.60>
- Hashem, N., El-Hady, A., & Hassan, O. (2013). Effect of vitamin E or propolis supplementation on semen quality, oxidative status and hemato-biochemical changes of rabbit bucks during hot season. *Livestock Science*, 157(2-3), 520-526. doi: 10.1016/j.livsci.2013.09.003
- Mosbah, R., Yousef, M., & Mantovani, A. (2015). Nicotine-induced reproductive toxicity, oxidative damage, histological changes and haematotoxicity in male rats: The protective effects of green teaextract. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(3), 253-259. doi: 10.1016/j.etp.2015.01.001
- Yousef, M., Abdallah, G., & Kamel, K. (2003). Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, 76(1-2), 99-111. doi: 10.1016/s0378-4320(02)00226-9
- Zanchi, M., M., Manfredini, V., Brum D., S., Vargas L., M., Spiazzi C., C., Soares M., B., ... & Santos W., F. (2015). Green tea infusion improves cyclophosphamide-induced damage on male mice reproductive system. *Toxicology Reports*, 2, 252-260. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.12.016

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Radicales libres y estrés oxidativo

El metabolismo energético indispensable para la vida implica la utilización de oxígeno, el cual se reduce en pequeñas dosis a superóxido, una sustancia conocida como radical libre (Li, Wuliji, Li, Jiang, & Ghanbari, 2013).

Un radical libre es una molécula altamente reactiva con uno o más electrones impares que desestabiliza la molécula estable más cercana, lo que genera una reacción en cascada (Agarwal, Abdelrazik, & Sharma, 2008). Entre los radicales libres podemos encontrar las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales tienen una función fisiológica en la maduración, la capacitación y la hiperactivación espermática, entre otros (Kothari, Thompson, Agarwal, & du Plessis, 2010).

Las membranas espermáticas en los mamíferos son ricas en ácidos grasos poliinsaturados, siendo altamente vulnerables al daño producido por la peroxidación de lípidos, y por tanto a las ROS (Attia et al., 2017). En caso de existir un desequilibrio entre la producción de ROS y las capacidades antioxidantes de la célula se genera un estrés oxidativo, el cual se ha reportado como un factor que contribuye al daño de ADN, apoptosis, peroxidación lipídica, y reducción de la viabilidad y motilidad espermática (Ye et al., 2020).

La sobreproducción de ROS en el plasma seminal puede ocasionarse tanto por factores exógenos (relacionado estrechamente con exposición a las condiciones ambientales) como endógenos.

Las principales fuentes endógenas son: a) leucocitos (neutrófilos y macrófagos), como parte de su función inmune, y b) espermatozoides inmaduros, asociado con una espermatogénesis alterada que no permite la extrusión adecuada del citoplasma, generando así una sobreproducción de ROS a través de su sistema mitocondrial (Agarwall et al., 2008).

2.2. Sistemas antioxidantes

Los seres vivos han desarrollado sistemas antioxidantes con la finalidad de mantener niveles adecuados de ROS, para su estudio se han clasificado en:

Enzimáticos. Existe un trabajo en conjunto entre diversas enzimas, donde resaltan la superóxido dismutasa (SOD), que se modifica según su ubicación. Es así que se le conoce como CuZnSOD (SOD1) cuando se encuentra en el citoplasma, el núcleo y los microsomas; MnSOD (SOD2) al estar en la matriz mitocondrial; y ECSOD (SOD3) al presentarse extracelularmente (Carvajal, 2019). Por otro lado, las catalasas y varias peroxidasas catalizan una compleja cascada de reacciones para convertir a las ROS en moléculas más estables, como agua y O₂ (Rahal et al., 2014).

No enzimáticos. En conjunto con dichas enzimas primarias, una gran variedad de compuestos secundarios se asocia estrechamente con antioxidantes de bajo peso molecular, tales como las vitaminas E y C, ácido úrico, ácido lipoico, glutatión y flavonoides, entre otros (Li et al., 2013).

Los flavonoides comprenden un gran grupo de compuestos polifenólicos presentes en frutas, verduras y hierbas. Se definen como metabolitos vegetales secundarios y se han descrito alrededor de 4,000 especies moleculares, incluyendo flavones, catequinas, quercetina y flavononas (Rahal et al., 2014).

2.3. Flavonoides como antioxidantes y pro oxidantes

La función antioxidante de los flavonoides es generada gracias a la donación de átomos de hidrógeno a los radicales libres, los cuales logran estabilizarse lo suficiente para no continuar la reacción en cascada (Carvajal, 2019).

Los flavonoides pueden penetrar la bicapa lipídica de las membranas, lo cual es posible que brinde protección al espermatozoide y la membrana acrosomal, asegurando así la reacción del acrosoma necesaria para la fertilización (Moretti et al., 2012).

Attia et al. (2017) reportan que la suplementación con semillas de cardo mariano (*Silybum marianum*) y romero (*Rosmarinus officinalis* L) a 10 y 5 g.kg⁻¹ respectivamente, mejoraron significativamente el estado antioxidante, la calidad del semen y la fertilidad en conejos; asociado con su composición fitoquímica incluyendo polifenoles y flavonoides. Vizzari et al. (2021) encontraron cambios favorables en marcadores antioxidantes del plasma seminal de conejos, tales como una disminución de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato amino transferasa (AST), las cuales suelen ser indicadores de estrés oxidativo y responsables del daño de la membrana espermática. Dichos resultados se encontraron al suplementar a los conejos con un compuesto de polisacáridos de algas pardas más ácido fenólico, ácidos hidroxicinámicos, taninos y flavonoides de extractos de plantas.

Lotito y Frei (2006) sostienen que existen inconsistencias entre lo obtenido *in vitro* y lo *in vivo*, y que los flavonoides tienen muy poca actividad antioxidante, asociado con su limitada biodisponibilidad y su extenso metabolismo.

Halliwell (2008) expone que los polifenoles pueden ejercer actividades pro oxidantes en determinadas condiciones experimentales, especialmente cuando se habla de condiciones *in vivo*. En este tenor, Akagawa, Shigemitsu y Suyama (2003) evaluaron en condiciones *quasi* fisiológicas el extracto de té verde, té negro y café, posterior a su exposición a 90 °C, que arrojó como resultado un aumento en la presencia de H₂O₂ asociado a los polifenoles, además de mostrar que estos se oxidan fácilmente.

Existe información contradictoria, donde se argumenta que los efectos pro oxidantes pueden resultar beneficiosos, ya que, al generar un leve grado de estrés oxidativo, los niveles de defensas antioxidantes del individuo podrían aumentar y generar una citoprotección generalizada (Fahey & Kensler, 2007).

2.4. Té verde (*Camellia sinensis*)

De acuerdo con Coimbra et al. (2006), según el proceso al que se someten las hojas de la planta *Camellia sinensis*, da lugar a: 1) té negro (resultado de una etapa de fermentación completa antes de secarse y exponerse al vapor), 2) té oolong (obtenido cuando las hojas frescas se someten a una fermentación parcial antes de secar), y 3) té verde (producido por secar y cocer al vapor las hojas frescas y, por lo tanto, sin fermentación).

El tratamiento al que se haya expuesto la *Camellia sinensis*, dará una compleja composición química; en caso del té verde incluye polifenoles, alcaloides (cafeína, teofilina y teobromina), aminoácidos, carbohidratos, proteínas, clorofila, compuestos volátiles, flúor, y otros compuestos indefinidos. Además, contiene oligoelementos que son esenciales para la homeostasis, tales como cromo, manganeso, selenio y zinc (Cabrera, Giménez, & López, 2003).

El té verde se ha considerado como una bebida medicinal y saludable desde la antigüedad, no obstante, recientemente ha recibido mayor atención en el campo científico, debido a sus fuertes propiedades antioxidantes derivadas de su contenido de polifenoles, que son los principales componentes solubles en agua de las infusiones (Cabrera, Giménez & López, 2003; El-Ratel, Abdel-Khal, El-Harairy, Fouda, & El-Bnaw, 2017).

Mosbah, Yousef y Mantovani (2015) evaluaron los efectos seminales del té verde en ratas con daño reproductivo inducido por nicotina; el extracto de té verde previno la baja de peso por los efectos de la nicotina y disminuyó los indicadores de estrés oxidativo. En un trabajo similar, se estudiaron las características reproductivas en ratones con daño inducido por ciclofosfamida. La concentración espermática de los ratones que recibieron un pretratamiento de té verde fue más alta comparada con los otros grupos, y disminuyó la peroxidación lipídica (Zanchi et al., 2015). Asimismo, la administración de un producto comercial conformado principalmente de licopeno, galato de epigallocatequina (extracto de té verde), ácido elágico (extracto de granada), selenio y zinc mostró un aumento

dependiente de la dosis en la viabilidad espermática de humanos (Lombardo et al., 2011).

El-Ratel et al. (2017) evaluaron diferentes dosis de extracto de té verde en el comportamiento reproductivo de conejas; encontraron que la administración oral diaria con el extracto de té verde durante 30 días antes del apareamiento mejoró la tasa de gestación. Por el contrario, Baláži et al. (2019) realizaron observaciones tanto *in vivo* como *in vitro* que sugieren que el té verde administrado en la dieta, reduce las funciones ováricas y la fecundidad, asociado con la epigallocatequina.

Dentro de los polifenoles del té verde se destacan las catequinas, pertenecientes al grupo de flavonoides, y constituyen hasta 30% del peso seco de las hojas de té verde (El-Ratel et al., 2017).

Se considera a las catequinas como el componente activo más importante del té verde, ya que poseen una alta actividad antioxidante, incluso mayor que la de la vitamina C (Roychoudhury, Agarwal, Virk, & Cho, 2017).

Las principales catequinas del té son el galato de epigallocatequina (EGCG), la epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) y epicatequina (EC), siendo el EGCG el más abundante además de ser el compuesto más activo (Kim, Shin, & Chung, 2003).

A pesar de variedad de documentos que soportan las propiedades antioxidantes de las catequinas del té verde, también se ha mostrado evidencia de su actividad prooxidante. La estabilidad de EGCG se asocia a su concentración, el pH, la presencia de oxígeno y la temperatura. Cuando EGCG y EGC reaccionan con H_2O_2 , ambos compuestos se oxidan, y en presencia de hierro o cobre resultan en radical hidroxilo (OH) con efecto prooxidante (Roychoudhury et al., 2017; Suh et al., 2010).

2.5. Características generales del sistema reproductivo del conejo adulto

El aparato reproductor del conejo coincide con el de la mayoría de los mamíferos. Posee dos testículos que pueden deslizarse por el canal inguinal del músculo *cremáster* externo, que se encuentra bien desarrollado. Los testículos contienen el compartimento tubular seminífero, y a su vez las células espermatogénicas y las células de Sertoli que ocupan la mayor parte de este. En el compartimento adluminal se encuentran las células de Leydig, encargadas de la producción de testosterona, indispensable para el adecuado funcionamiento de los órganos sexuales secundarios y de la libido (Foote & Carney, 2000; Varga & Harcourt-Brown, 2014).

De acuerdo con Foote y Carney (2000), un ciclo del epitelio seminífero dura 10.7 días, y requiere de 4.5 ciclos para completar un espermatozoide maduro; datos similares a los expuestos por Boiti et al. (2005), donde señalan que el ciclo dura entre 7 y 8 semanas.

El semen se conforma por espermatozoides suspendidos en un medio líquido, con compuestos procedentes de diferentes ubicaciones del epidídimo y las glándulas accesorias, que, al momento de la eyaculación, se combinan (Alvariño, 2000; Boiti et al. 2005).

Para la colecta de semen se emplea una vagina artificial llena de líquido (alrededor de 45° C). Se emplea una hembra de apoyo a la vez que se presenta al macho. Algunos autores han confirmado que la estimulación previa del macho aumenta la concentración de esperma, y puede ser útil dejar previamente a la coneja encima de la jaula del macho durante varios minutos (Boiti et al. 2005; Rodríguez-De Lara et al., 2010).

La frecuencia de recolección de semen es sugerida una vez a la semana, recolectando dos eyaculados en un período de 15 minutos (Mocé, Lavara, Lavara, & Vicente, 2000).

2.6. Evaluación seminal

De acuerdo con Lavara, Mocé y Vicente (2003), los parámetros de calidad seminal buscados en cunicultura son: porcentaje de motilidad superior al 70%, normalidad acrosómica superior al 80%, porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática entre 6 y 10%, y espermatozoides anormales menor al 15%.

2.6.1. Evaluación convencional

El análisis espermático de manera visual está fuertemente relacionado con la experiencia del técnico de laboratorio, aunado a ello la falta de estándares universales da por resultado una evaluación subjetiva (Quintero-Moreno et al., 2007).

A nivel macroscópico se reportan volumen, pH y color. Para su análisis microscópico se valora el comportamiento, movilidad, morfología y vitalidad espermática; así como la presencia de otros componentes, tales como gel, orina, y células hemáticas y linfáticas (Boiti et al. 2005).

2.6.2. Sistema de análisis seminal asistido por computadora (CASA)

Valverde y Madrigal-Valverde (2019) sostienen que el sistema CASA disminuye la subjetividad de los análisis tradicionales de semen, ya que posee módulos que valoran de manera fiable la cinética, morfología, morfometría, integridad de membranas, fragmentación de ADN y fluorescencia. Las variables consideradas para este estudio se exponen en el Cuadro 1 (al final del Capítulo). A continuación, se detallan algunas características de los módulos de cinética y morfología, por su importancia en la presente investigación.

Cinética

La motilidad se obtiene a través de la evaluación del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo, es decir, se captura un punto en el primer fotograma y de ahí en las siguientes imágenes se predice la probable trayectoria. La relación existente entre esta serie de puntos origina la trayectoria real y, por tanto, la velocidad promedio a lo largo de esta trayectoria se conoce como velocidad curvilínea (VCL; Valverde & Madrigal-Valverde, 2018). La velocidad

promedio de la trayectoria del espermatozoide, calculada a partir de la trayectoria de la VCL se conoce como velocidad promedio de trayectoria (VAP; Fabbrocini et al., 2016). La velocidad trazada desde el primer punto hasta el último se denomina velocidad rectilínea (VSL; Valverde y Madrigal-Valverde, 2019).

Una vez analizadas dichas trayectorias se obtienen los índices de linealidad ($LIN = VSL/VCL$), rectitud ($STR = VSL/VAP$) y oscilación ($WOB = VAP/VCL$), y es así como se analiza la calidad del movimiento (Valverde & Madrigal-Valverde, 2018).

Por último, la evaluación se complementa con el número de intersecciones causadas por la trayectoria curvilínea y la trayectoria rectilínea que da origen a la frecuencia de golpe cruzado (BCF) y con la altura máxima de la amplitud del movimiento oscilatorio de la trayectoria curvilínea (ALH; Valverde y Madrigal-Valverde, 2018).

Morfología

El análisis morfológico es el reflejo del estado fisiológico de testículos, epidídimo y glándulas accesorias (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019). Las anomalías según su origen pueden ser catalogadas como primarias (durante la espermiogénesis) o secundarias (durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo) (Barth & Oko, 1989).

Las anomalías presentadas con mayor frecuencia y relevancia son: cabezas sueltas, cabezas dobles, colas enrolladas, doble cola y gota citoplasmática proximal (Valverde & Madrigal-Valverde, 2018).

Cuadro 1. Nominación y descripción de variables consideradas en el presente estudio.

No.	Variable	Unidad	Abreviatura	Descripción
		de medida		

1	Espermatozoides estáticos	%	EE	Espermatozoides con inmovilidad (Quintero-Moreno, 2003).
2	Motilidad total	%	MT	Espermatozoides móviles totales en activación (Fabbrocini et al., 2016).
3	Motilidad progresiva	%	MP	Avance del espermatozoide de forma continua (Bajo, Coroleu, & Pérez, 2009).
4	Velocidad rectilínea	μm/s	VSL	Velocidad desde el punto de inicio hasta el punto final de la trayectoria en línea recta (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019).
5	Velocidad curvilínea	μm/s	VCL	Velocidad sobre la trayectoria real de punto a punto seguida por el espermatozoide (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019).
6	Velocidad promedio de trayectoria	μm/s	VAP	Velocidad promedio de la trayectoria del espermatozoide, calculada a partir de la trayectoria de la VCL (Fabbrocini et al., 2016).
7	Índice de linealidad	%	LIN	Relación de progresión $LIN = VSL / VCL * 100$ (Quintero-Moreno, 2003).
8	Índice de rectitud	%	STR	Relación de progresión $STR = VSL / VAP * 100$ (Quintero-Moreno, 2003).
9	Índice de oscilación	%	WOB	Relación de progresión $(WOB = VAP / VCL * 100)$ (Quintero-Moreno, 2003).
10	Amplitud media del desplazamiento lateral de la	μm	ALH	La altura media o máxima de la amplitud del movimiento oscilatorio de la trayectoria curvilínea

	cabeza del espermatozoide			(Valverde & Madrigal-Valverde, 2019).
11	Frecuencia de golpe cruzado	Hz	BCF	Número de veces que la trayectoria curvilínea cruza la trayectoria rectilínea (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019).
12	Distancia de línea recta	μm	DSL	Línea recta desde el inicio hasta el final de la trayectoria (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019).
13	Distancia curvilínea	μm	DCL	Trayectoria real de punto a punto seguida por el espermatozoide (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019).
14	Distancia promedio de trayectoria	μm	DAP	Distancia calculada por la interpolación a partir de la trayectoria de la VCL (Valverde & Madrigal-Valverde, 2019).
15	Viabilidad espermática	%	VE	Espermatozoides vivos, reflejado por la integridad de la membrana plasmática y acrosomal (Cabrera & Pantoja, 2012).
16	Espermatozoides normales	%	EN	Más del 70% de los espermatozoides posean morfología normal. (Quintero-Moreno, A. 2003).
17	Colas dobladas	%	CD	Defectos en la cola del espermatozoide que afectan el movimiento (Gómez-Torres, Girela, Fernández-Colom, Romeu, & De Juan, 2005).
18	Colas enrolladas	%	CE	
19	Gota citoplasmática proximal	%	GCP	Originada en la fase de maduración al eliminarse por desplazamiento parte

20	Gota citoplasmática distal		GCD	del citoplasma hacia la porción terminal de la cola (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006).
21	Número de espermatozoides vivos normales motiles progresivos por volumen de eyaculado	×10 ⁶		Evaluación morfológica.
22	Número de dosis potenciales para uso en inseminación artificial	Números ordinales		

2.7. Literatura citada

- Agarwal, A., Abdelrazik, H., & Sharma, R. K. (2008). Oxidative stress management in patients with male or female factor infertility. *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment*. 195.
- Akagawa, M., Shigemitsu, T., & Suyama, K. (2003). Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(12), 2632–2640. doi:10.1271/bbb.67.2632
- Alvariño, M. R. (2000). Reproductive performance of male rabbits. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress*, 13-35.
- Attia, Y., Hamed, R., Bovera, F., El-Hamid A., A., Al-Harthi, M., & Shahba, H. (2017). Semen quality, antioxidant status and reproductive performance of rabbits bucks fed milk thistle seeds and rosemary leaves. *Animal Reproduction Science*, 184, 178-186. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.07.014
- Bajo, A., J., Coroleu L., B., & Pérez M., F. (2009) *Fundamentos de Reproducción*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Baláži, A., Sirotkin, A., Földešiová, M., Makovický, P., Chrastinová, L., Makovický, P., & Chrenek, P. (2019). Green tea can suppress rabbit ovarian functions *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology*, 127, 72-79. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.010
- Barth, A. D., & Oko, J. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Ames, IA, USA.

- Boiti, C., Castellini C., Theau-Clement M., Besenfelder, U., Liguori, L., Renieri, T., & Pizzi, F. (2005). Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science*, 13, 71-91.
- Cabrera, C., Giménez, R., & López, M. C. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4427-4435. doi:10.1021/jf0300801
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
- Coimbra, S., Castro, E., Rocha-Pereira, P., Rebelo, I., Rocha, S., & Santos-Silva, A. (2006). The effect of green tea in oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 25(5), 790-796. doi:10.1016/j.clnu.2006.01.022
- El-Ratel, I., Abdel-Khal, A., El-Harairy, M., Fouda, S. F., & El-Bnaw, L. Y. (2017). Impact of green tea extract on reproductive performance, hematology, lipid metabolism and histogenesis of liver and kidney of rabbit does. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(2), 51-60. <https://doi.org/10.3923/ajava.2017.51.60>
- Fabbrocini, A., D'Adamo, R., Del Prete, F., Maurizio, D., Specchiulli, A., Oliveira, L., ... & Sansone, G. (2016). The sperm motility pattern in ecotoxicological tests. The CRYO-Ecotest as a case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123, 53-59. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.08.018
- Fahey, J. W., & Kensler, T. W. (2007). Role of dietary supplements/nutraceuticals in chemoprevention through induction of cytoprotective enzymes. *Chemical Research in Toxicology*, 20(4), 572-576. doi:10.1021/tx7000459
- Foote, R., & Carney, E. (2000). The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. *Reproductive Toxicology*, 14(6), 477-493. doi: 10.1016/s0890-6238(00)00101-5
- Gómez-Torres, M., Girela, L., Fernández-Colom, P., Romeu, A., & De Juan, J. (2005). Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopía electrónica de barrido (SEM). *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 22(1).
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 107-112. doi:10.1016/j.abb.2008.01.028
- Kim, J. E., Shin, M. H., & Chung, J. H. (2013). Epigallocatechin-3-gallate prevents heat shock-induced MMP-1 expression by inhibiting AP-1 activity in human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research*, 305(7), 595-602. doi:10.1007/s00403-013-1393-y
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., & du Plessis, S. (2010). Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 425-435.

- Lavara, R., Mocé, E., & Vicente, J. (2003). Buenas prácticas en inseminación artificial. *Lagomorfa*, 128, 14-23.
- Li, J., Wuliji, O., Li, W., Jiang, Z.-G., & Ghanbari, H. (2013). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24438-24475. doi:10.3390/ijms141224438
- Lombardo, F., Fiducia, M., Lunghi, R., Marchetti, L., Palumbo, A., Rizzo, F., & Gandini, L. (2011). Effects of a dietary supplement on chronic pelvic pain syndrome (Category IIIA), leucocytospermia and semen parameters. *Andrologia*, 44, 672-678. doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01248.x
- Lotito, S., & Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1727-1746. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.033
- Mocé, E., Lavara, R., Lavara, F., & Vicente, J. S. (2000). Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line with high growth rate. *Proceedings of the 7 th World Rabbit Congress*, 197-201.
- Moretti, E., Mazzi, L., Terzuoli, G., Bonechi, C., Iacoponi, F., Martini, S., ... & Collodel, G. (2012). Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reproductive Toxicology*, 34(4), 651-657. doi:10.1016/j.reprotox.2012.10.002
- Mosbah, R., Yousef, M., & Mantovani, A. (2015). Nicotine-induced reproductive toxicity, oxidative damage, histological changes and haematotoxicity in male rats: The protective effects of green tea extract. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(3), 253-259. doi: 10.1016/j.etp.2015.01.001
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436. Retrieved 6 June 2020, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008&lng=en&tlng=es.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. (2007). Multivariate cluster analysis regression procedure as tools to identify motile sperm subpopulation in rabbit semen fertility and litter size. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 312-319.
- Quintero-Moreno, A. (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative Stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, 1-19. doi:10.1155/2014/761264
- Rodríguez-De Lara, R., Noguez-Estrada, J., Rangel-Santos, R., García-Muñiz, J., Martínez-Hernández, P., Fallas-López, M., & Maldonado-Siman, E. (2010).

- Controlled doe exposure as biostimulation of buck rabbits. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 270-275. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.09.002
- Roychoudhury, S., Agarwal, A., Virk, G., & Cho, C.-L. (2017). Potential role of green tea catechins in the management of oxidative stress-associated infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 34(5), 487-498. doi:10.1016/j.rbmo.2017.02.006
- Suh, K. S., Chon, S., Oh, S., Kim, S. W., Kim, J.-W., Kim, Y. S., & Woo, J.-T. (2009). Prooxidative effects of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. *Cell Biology and Toxicology*, 26(3), 189–199. doi:10.1007/s10565-009-9137-7
- Valverde, A., & Madrigal-Valverde, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469-484. <https://dx.doi.org/10.15517/ma.v29i2.30613>
- Valverde, A., & Madrigal-Valverde, M. (2019). Evaluación de cámaras de recuento sobre parámetros espermáticos de verracos analizados con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana*, 447-458. doi: 10.15517/am.v30i1.34145
- Varga, M., & Harcourt-Brown, F. (2014). Textbook of rabbit medicine (2nd ed.). Toronto: ELSEVIER.
- Vizzari, F., Massányi, M., Knížatová, N., Corino, C., Rossi, R., Ondruška, L., ... Massányi, P. (2021). Effects of dietary plant polyphenols and seaweed extract mixture on male-rabbit semen: Quality traits and antioxidant markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 1017–1025. doi:10.1016/j.sjbs.2020.11.043
- Ye, R., Yang, J., Hai, D., Liu, N., Ma, L., Lan, X. Niu, J. G., Zheng, P., & Yu, J. Q. (2020). Interplay between male reproductive system dysfunction and the therapeutic effect of flavonoids. *Fitoterapia*, 147. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104756>
- Yousef, M., Abdallah, G., & Kamel, K. (2003). Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, 76(1-2), 99-111. doi: 10.1016/s0378-4320(02)00226-9
- Zanchi, M., M., Manfredini, V., Brum D., S., Vargas L., M., Spiazzi C., C., Soares M., B., ... & Santos W., F. (2015). Green tea infusion improves cyclophosphamide-induced damage on male mice reproductive system. *Toxicology Reports*, 2, 252-260. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.12.016

Este capítulo fue preparado para ser enviado a *Animal Reproduction Science*

3. COMPORTAMIENTO SEXUAL, CALIDAD SEMINAL Y POTENCIAL REPRODUCTIVO EN CONEJOS SUPLEMENTADOS CON POLIFENOLES DE TÉ VERDE

Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo,
Km. 38.5 Carretera México – Texcoco. Chapingo, Estado de México. México. C.P. 56230

RESUMEN GENERAL

COMPORTAMIENTO SEXUAL, CALIDAD SEMINAL Y POTENCIAL REPRODUCTIVO EN CONEJOS SUPLEMENTADOS CON POLIFENOLES DE TÉ VERDE¹

Se determinó el efecto de suplementar conejos con polifenoles de té verde en el comportamiento sexual, calidad seminal, cinética de movimiento espermático, morfología y potencial reproductivo. Se asignaron aleatoriamente 30 conejos Nueva Zelanda Blanco de 8 meses de edad a uno de dos tratamientos experimentales: 1) suplementación con 50 mg kg⁻¹ de peso vivo de té verde por día, administrados en el agua de bebida; 2) sin suplemento. El suplemento fue administrado cinco días antes de la colección de semen cada semana durante 13 sesiones, con dos eyaculados por macho en cada sesión. El diseño experimental fue completamente al azar con dos tratamientos y 15 réplicas por tratamiento, la unidad experimental fue un conejo. Se evaluaron un total de 676 eyaculados. El suplemento de polifenoles de té verde mejoró ($p<0.05$) el volumen seminal (+8.35%) y la concentración espermática por eyaculado (+15.3%) pero disminuyó la motilidad total ($p=0.05$; -2.6%). La suplementación incrementó ($p<0.05$) el índice de linealidad (+3.3%), índice de oscilación (+2.5%), frecuencia de golpe cruzado (+5.1%), distancia de línea recta (+5.6%) y en la distancia promedio de trayectoria espermática (+4.2%), así como una disminución ($p=0.04$; -4.3%) en la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza. No obstante, conejos suplementados mostraron un incremento en el porcentaje de espermatozoides con gotas proximales citoplasmáticas ($p=0.03$; +21.0%). Al final, el número de espermatozoides normales motiles progresivos por eyaculado y número de dosis para uso en inseminación artificial tendieron ($p=0.097$) a ser superiores en conejos suplementados, al producir en promedio 7.5 millones más de estos espermatozoides (+11.7%) y 1.5 más dosis (+11.6%). La suplementación con polifenoles de té verde mejora la concentración espermática por volumen de eyaculado, la motilidad progresiva, los parámetros de cinética progresiva de movimiento espermático y el potencial reproductivo en conejos.

Palabras clave: *Camellia sinensis*, antioxidante, reproducción, conejo macho.

¹ Tesis de Maestría en Ciencias en Innovación Ganadera, Universidad Autónoma Chapingo

Autor: Rocío Mentado Amigón

Director de tesis: Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara

GENERAL ABSTRACT

SEXUAL BEHAVIOR, SEMEN QUALITY, AND REPRODUCTIVE POTENTIAL IN RABBITS SUPPLEMENTED WITH POLYPHENOLS OF GREEN TEA²

The effect of supplementing rabbits with polyphenols of green tea, on sexual behavior, seminal quality, sperm movement kinetics, morphology, and reproductive potential was determined. Thirty 8-month-old New Zealand White male rabbits were randomly assigned to one of two experimental treatments: 1) supplementation with 50 mg kg⁻¹ of body live weight of green tea extract per kg of body live weight per day, administered in the drinking water; 2) no supplementation. The supplement was administered five days before semen collection each week for 13 sessions, with two ejaculates per male at each session. The experimental design was completely randomized with two treatments and 15 replicates per treatment; the experimental unit was one rabbit. A total of 676 ejaculates were evaluated. The polyphenols of green tea supplement improved ($p<0.05$) seminal volume (+8.35%) and sperm concentration per ejaculate (+15.3%) but decreased total motility ($p=0.05$; -2.6%). The supplement increases ($p<0.05$) in linearity index (+3.3%), oscillation index (+2.5%), cross stroke frequency (+5.1%), straight-line distance (+5.6%) and in average sperm path distance (+4.2%), as well as a decrease ($p=0.04$; -4.3%) in mean head lateral displacement amplitude. Nevertheless, supplemented rabbits showed an increase in the percentage of proximal cytoplasmic droplets ($p=0.03$; +21.0%). In the end, the number of normal progressive motile spermatozoa per ejaculate and number of doses for use in artificial insemination tended ($p=0.097$) to be higher in supplemented rabbits by producing on average 7.5 million more of these spermatozoa (+11.7%) and 1.5 more doses (+11.6%). Supplementation with polyphenols of green tea improves sperm concentration per volume of ejaculate, progressive motility, progressive kinematics parameters of sperm movement, and reproductive potential.

Keywords: *Camellia sinensis*, antioxidant, reproduction, buck rabbits.

² Science Master in Livestock Innovation thesis, Universidad Autónoma Chapingo

Author: Rocío Mentado Amigón

Advisor: Ph.D. Raymundo Rodríguez de Lara

3.1. Introducción

En conejos bajo monta natural, pueden presentarse detrimentos en la calidad seminal, particularmente en estaciones críticas del año, disminuyendo la eficiencia reproductiva, y afectando los ingresos y la rentabilidad de granjas cunícolas (Cruz-Bacab, Ramírez-Vera, Vázquez-García, & Zapata-Campos, 2018).

Una de las causas asociadas a esta merma es la sobreproducción de radicales libres, los cuales son moléculas altamente reactivas con uno o más electrones impares que desestabilizan la molécula estable más cercana, lo que genera una reacción en cascada (Agarwal, Abdelrazik, & Sharma, 2008). Entre los radicales libres podemos encontrar las especies reactivas de oxígeno, las cuales oxidan la membrana celular del espermatozoide, dañando el ADN y reduciendo su capacidad fertilizante (Hashem, El-Hady, & Hassan, 2013; Yousef, Abdallah, & Kamel, 2003). Para prevenir dicha oxidación se han investigado los metabolitos y extractos derivados de plantas (también conocidos como fitogénicos), ya que se ha reportado que disminuyen los radicales libres directa o indirectamente regulando la fase II de las enzimas antioxidantes (Zanchi et al., 2015).

Una de las plantas que ha recibido mayor atención en el campo científico, debido a sus fuertes propiedades antioxidantes derivadas de su contenido de polifenoles especialmente por las catequinas, es el té verde (*Camellia sinensis*) (Cabrera, Giménez, & López, 2003; El-Ratel, Abdel-Khal, El-Hairry, Fouda, & El-Bnaw, 2017).

Existe escasa información en conejos sobre los efectos de polifenoles de té verde, aunque en otras especies como en las ratas, ha mostrado la disminución del daño de la membrana espermática en animales expuestos a diversas dosis de nicotina (Mosbah, Yousef, & Mantovani, 2015).

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de suplementar polifenoles de té verde en el comportamiento sexual, y en los diferentes parámetros seminales y espermáticos de conejos.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Localización

El estudio se realizó en “Conejos” Centro de Investigación Científica del Estado de México A.C. (COCICEMAC), localizado en San Miguel Coatlinchán, Texcoco, Estado de México, a 19' 27" N, 98' 53" O y 2,220 m sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es 15.9 °C y 645 mm de lluvias anuales. El estudio se realizó durante 13 semanas en la época de primavera. El trabajo experimental se inició el 10 de mayo y finalizó el 17 de agosto de 2021.

3.2.2. Animales, tratamientos y diseño experimental

Los animales experimentales se mantuvieron y trataron de acuerdo con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, 2001).

Treinta conejos Nueva Zelanda Blanco de 8 meses de edad fueron pesados y distribuidos en dos grupos homogéneos por pesos y asignados al azar a uno de dos tratamientos experimentales: 1) suplementación con 50 mg kg⁻¹ de peso vivo de extractos estandarizados de hojas de la planta *Camellia sinensis*, administrado en el agua de bebida; 2) sin suplementación o control. El diseño experimental fue completamente al azar, con dos tratamientos y 15 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un conejo. Los extractos de té verde fueron diluidos en 100 ml de agua de bebida en bebederos plásticos graduados semi-automáticos, proporcionados en las primeras horas de la mañana durante cinco días continuos, de lunes a viernes, seguidos por dos días de descanso. Se realizó una colecta de semen por semana en 13 sesiones durante la estación de primavera y parte de verano. En cada día de trabajo o sesión se extrajeron dos eyaculaciones por macho, la segunda inmediatamente después de la primera.

3.2.3. Instalaciones

Los conejos se alojaron en un módulo de ambiente natural provisto de aislamiento térmico tanto en el techo como en las paredes, con ventanas laterales abiertas. Se mantuvieron individualmente en jaulas metálicas galvanizadas de 45 cm de

largo por 30 cm de ancho por 40 cm de alto, dispuestas en un sistema *flat-deck* o en línea. Las jaulas de los conejos del tratamiento dos o control fueron provistas de bebederos automáticos tipo tetina, mientras que los conejos del tratamiento uno con bebederos semi-automáticos con capacidad de un litro. Los comederos de las jaulas fueron de tolva tipo inglés con capacidad de 1.5 kg. Los conejos recibieron luz natural.

3.2.4. Manejo alimenticio

A los conejos se les proporcionó 150 g día⁻¹ de alimento comercial peletizado (Conejo Reproductor, Tepexpan®) con 17.4% de proteína cruda, 5.3% de grasa, 15% de fibra cruda, 8.0 % de cenizas, 44.2% de extracto libre de nitrógeno, 1.2% de calcio, 0.7% de fósforo, 2608 Kcal de energía digestible Kg⁻¹ y 10.1% de humedad. El alimento comercial provisto de minerales, elementos traza, vitaminas del complejo B, vitaminas solubles en grasa incluyendo vitaminas A, D3, E y K3, absorbentes para micotoxinas, acidificantes, saborizantes naturales y antioxidantes.

3.2.5. Manejo y administración de los extractos de té verde

Se utilizó un extracto seco en polvo estandarizado de las hojas de la planta *Camellia sinensis*, con un alto contenido de polifenoles, 90% (metabolika, extractos product). Los conejos del tratamiento uno, fueron sometidos a un periodo de 15 días de adaptación con té verde administrado en el agua de bebida. Posteriormente, desde el inicio hasta el final del experimento, los extractos fueron proporcionados cinco días continuos, de lunes a viernes de cada semana, seguidos por dos días de descanso, hasta completar las 13 sesiones del estudio. Para calcular la dosis de extracto de té verde, 50 mg por kg de peso vivo día⁻¹, los machos eran pesados utilizando una balanza digital en los días de colección de semen cada semana. Con base en este peso se calculaba la cantidad de extracto a proporcionar cada día a cada macho individual durante la semana. Las pesadas de las cantidades de extracto de té verde a proporcionar se realizaron utilizando una báscula electrónica. La administración del extracto en los días

programados fue realizada entre las 7:00 y 8:00 a.m. Las dosis en polvo de polifenoles de té verde para cada macho se diluían en 100 mL de agua de bebida y administrada en los bebederos semi-automáticos. Durante el transcurso de la mañana, los conejos que consumían en su totalidad los extractos se le proporcionaba agua a discreción al rellenar sus bebederos individuales. La mayor parte de los machos tratados consumían en su totalidad la dosis en cada día. Los conejos en el grupo control recibían agua a discreción mediante bebederos automáticos.

3.2.6. Colección de semen y variables de respuesta

Las extracciones de semen se iniciaron a las 8:00 a.m., una vez a la semana los sábados. Para la extracción de semen se utilizó una vagina artificial temperada a 45 °C, de acuerdo con el método de Walton (1945) y con la ayuda de una coneja de apoyo. El comportamiento sexual fue determinado por el tiempo de reacción, que corresponde al intervalo desde el momento de la introducción de la hembra de apoyo y vagina artificial dentro de la jaula del macho a la eyaculación, se midió mediante un cronómetro. Inmediatamente después de la colección de semen, los tubos con los eyaculados se colocaron en baño María a 32 °C, para su evaluación. Cuando las muestras presentaban gel se removía inmediatamente del tubo colector. Posteriormente, se midió el volumen seminal en el mismo tubo transparente graduado, con intervalos de 0.2 ml. El pH del semen se determinó utilizando cintas de papel pH-métrica con escalas entre 7 a 12, en intervalos de un grado (*Dual Tint*).

Para las determinaciones de la producción y calidad espermática se utilizó un sistema de análisis de semen computarizado (CASA IVOS II, v 1.7, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA). El sistema fue configurado de acuerdo con las recomendaciones para la evaluación del semen de conejo. El software utilizado fue calibrado por: objetivo, detección de células por su morfología, dimensiones de la cámara espermática, intensidad de iluminación LED, cinemática de movimiento y para normalidades o anormalidades morfológicas espermáticas. Una vez calibrado, se configuró y se estableció la dinámica de captura de video,

de acuerdo con la Guía de Hardware HT-IVOS Versión 1.5 Hamilton Thorne (Thorne, 2013). El software fue configurado y calibrado de acuerdo con los criterios mostrados en los Apéndices 1 y 2.

Las muestras seminales se diluían 1:5, 50 μL de semen en 250 μL de solución buffer salina fosfatada (SBSF; Dulbecco A; Oxoid Inc., UK). Una alícuota ($\pm 3 \mu\text{L}$) de esta dilución se analizó con el sistema CASA. La muestra se incubó por 2 min a 37 °C, dentro del IVOS II en una leja (porta objeto de profundidad fija desechable) de 20 micrones de profundo, para determinar la concentración espermática, movimiento y cinemática espermática, así como la morfología de los espermatozoides.

Las variables que se evaluaron por el sistema CASA fueron motilidad total, motilidad progresiva, concentración espermática por ml ($\times 10^6$), velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$); VCL: velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VAP: velocidad promedio de trayectoria ($\mu\text{m/s}$); LIN: índice de linealidad (%); STR: índice de rectitud (%); WOB: índice de oscilación (%); ALH: amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (μm); BCF: frecuencia de golpe cruzado (Hz); DSL: distancia de línea recta (Micrones); DCL: distancia curvilínea (Micrones); DAP: distancia promedio de trayectoria (Micrones); viabilidad espermática, normalidad, colas dobladas, colas enrolladas, gota citoplasmática proximal y gota citoplasmática distal; para esto se contaron al menos 400 espermatozoides por muestra.

Con la información recabada se calculó la concentración espermática por eyaculado ($\times 10^6$), el número de espermatozoides normales progresivos motiles por volumen de eyaculado. El número potencial de dosis para uso en inseminación artificial se estimó con base en la variable de respuesta anterior/5 millones.

3.2.7. Análisis estadístico

El tiempo de reacción, características seminales y espermáticas, movimiento y cinemática de movimiento espermático, morfología y variables de potencial

reproductivo fueron sometidos a un análisis de varianza considerando el siguiente modelo aditivo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + E_j + (T * E)_{ij} + b_1(X_{ijk} - \bar{X}) + b_2(X_{ijk} - \bar{X}) + \varepsilon_{ijk}$$

donde Y_{ijk} , es la variable respuesta; μ , es la media general; T_i , es el efecto fijo del i -ésimo tratamiento (i = con extracto de té verde, sin extracto); E_j , es el efecto fijo del j -ésimo eyaculado (j = primero, segundo); $(R * E)_{ij}$ es la interacción entre tratamiento y orden de eyaculado; b_1 es el coeficiente de regresión lineal de la covariable sesión de colección de semen; b_2 es el coeficiente de regresión lineal de la covariable peso del conejo al momento de colección de semen, y ε_{ijk} , es el residual $\sim NI(0, \sigma_e^2)$.

Las variables en porcentaje se transformaron utilizando arco seno, el tiempo de reacción y las concentraciones espermática mediante log 10. Todos los análisis de varianza se hicieron con los datos originales y transformados. Las covariables que no mostraron un efecto significativo ($p > 0.05$) fueron eliminadas del modelo y se volvió a realizar otra vez. Los análisis de varianza dieron los mismos patrones de respuesta cuando se utilizaron los datos transformados y originales. Los resultados del análisis de varianza que se presentan son con la información original.

Las variables de respuesta se analizaron mediante cuadrados medios mínimos, utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 2016). Las comparaciones de medias se realizaron utilizando la prueba de Tukey. Coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados mediante el procedimiento PROC de SAS (SAS, 2016).

3.3. Resultados y discusión

La frecuencia de extracción seminal fue extensiva, ya que se ha demostrado que la obtención de dos eyaculados en intervalos de 10 a 20 minutos por semana aumenta el volumen y concentración por eyaculado, esto asociado a un mayor

tiempo de recuperación para las glándulas accesorias y los espermatozoides almacenados (Arroita et al., 2000; Bencheikh, 1995; Niza, Di Meo, Taranto, & Stanco 2002; Niza, Di Meo, & Taranto, 2003; Paál et al., 2014)

Se evaluaron un total de 676 eyaculados de primera y segunda eyaculación, provenientes de 30 conejos machos durante 13 sesiones de colección de semen. En los Cuadros 2 y 3 se presentan las estadísticas descriptivas para el peso de los conejos al momento de la colección de semen, libido, características seminales y espermáticas, movimiento y cinemática espermática, morfología, número de espermatozoides normales progresivos motiles por eyaculado y número de dosis potenciales para uso en inseminación artificial.

Los coeficientes de variación más bajos correspondieron a los pesos de los machos al momento de la colección de semen (5.5) y el pH (3.8). Estos bajos coeficientes son similares a los 6.8 y 2.4 reportados por Rodríguez-De Lara et al. (2015) para estas mismas variables. La presencia de gel, el volumen seminal y las concentraciones espermáticas por ml y por eyaculado mostraron mayores variabilidades (149.6, 58.7, 63.5 y 93.4). Estos coeficientes de variación altos para estas características son similares a las reportados por varios estudios (García-Tomas, Sanchez, Rafael, Ramon, & Piles, 2006a; Lavara, Baselga, & Vicente, 2011; Lavara, Baselga, & Vicente, 2012). El porcentaje de espermatozoides estáticos mostró una alta variabilidad (81.8), mientras que los coeficientes de variación para las características de motilidad y cinética de movimiento espermática, en general fueron bajos, en un rango de 9.9 a 36.4, los cuales son similares a los reportados por otras investigaciones (Lavara, Baselga, & Vicente, 2010; Massányi et al., 2008; Mocé, Lavara, & Vicente, 2000; Quintero-Moreno et al., 2007; Safaa, Vicente, Lavara, & Viudes, 2008).

Cuadro 2. Estadísticos descriptivos y coeficientes de variación para el peso de los machos, comportamiento sexual, calidad seminal, y movimiento y cinemática espermática en conejos.

Variable	N	Min	Max	Media	DE	CV
Peso (g)	676	3175	4660	4097	226.5	5.5

Tiempo de reacción (s)	676	1.3	103.4	10.7	9.4	87.4
<i>Características seminales</i>						
Presencia de gel (%)	676	0.0	1.0	0.3	0.5	149.6
Volumen (mL)	676	0.0	2.0	0.6	0.4	58.7
pH	676	0.0	8.0	7.0	0.3	3.9
<i>Características espermáticas</i>						
<u>Producción</u>						
Concentración de espermatozoides (x 10 ⁶ mL ⁻¹)	676	4.5	734.4	200.2	127.1	63.5
Concentración de espermatozoides por eyaculado (x 10 ⁶)	676	0.0	1076.2	126.1	117.8	93.4
<u>Movimiento y cinemática espermática</u>						
Espermatozoides estáticos (%)	676	1.5	98.2	17.2	14.1	81.8
Motilidad total (%)	676	1.8	98.5	82.8	14.1	17.0
Motilidad progresiva (%)	676	0.8	91.6	54.4	19.8	36.4
VSL (µm/seg)	676	21.1	150.9	89.1	23.7	26.7
VCL (µm/seg)	676	49.9	302.3	188.5	35.9	19.0
VAP (µm/seg))	676	33.1	167.9	110.9	23.1	20.8
LIN (%)	676	19.9	75.3	49.2	10.3	20.9
STR (%)	676	36.8	96.0	80.1	11.8	14.7
WOB (%)	676	41.8	80.0	59.5	5.9	9.9
ALH (mm)	676	2.7	13.1	7.0	1.5	21.7
BCF (HZ)	676	18.7	87.4	38.1	4.7	12.4
DSL	676	8.9	71.6	37.0	11.4	30.9
DCL	676	20.5	131.6	79.4	15.5	19.5
DAP	676	13.0	76.8	46.1	10.3	22.3

DE= Desviación estándar; CV= Coeficiente de variación (%);VSL: Velocidad rectilínea (µm/s); VCL: Velocidad curvilínea (µm/s); VAP: Velocidad promedio de trayectoria (µm/s); LIN: Índice de linealidad (%);STR: Índice de rectitud (%);WOB: Índice de oscilación (%);ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (µm); BCF: Frecuencia de golpe cruzado (Hz); DSL: Distancia de línea recta (Micrones); DCL: Distancia curvilínea (Micrones); DAP: Distancia promedio de trayectoria (Micrones).

Cuadro 3 Estadísticos descriptivos y coeficientes de variación para normalidad espermática, morfología, concentración de espermatozoides normales motiles progresivos y dosis potenciales para inseminación artificial en conejos.

Variable	N	Min	Max	Media	DE	CV
Espermatozoides normales (%)	676	0.0	99.8	90.5	9.7	10.7
Espermatozoides con cola doblada (%)	676	0.0	45.6	5.5	9.6	174.5
Espermatozoides con cola enrollada (%)	676	0.0	38.4	3.2	5.5	169.3
Espermatozoides con gota distal (%)	676	0.0	31.0	5.0	4.7	94.4

Espermatozoides con gota proximal (%)	676	0.0	25.8	2.1	3.0	143.2
No. de espermatozoides normales motiles progresivos/eyaculado ($\times 10^6$)	676	-0.2	380.3	67.0	63.7	95.1
Número de dosis para uso en inseminación artificial	676	-0.0	76.1	13.4	12.7	95.1

Para el caso del porcentaje de espermatozoides normales, la variabilidad fue baja (10.7), mientras que para las características de anomalías morfológicas espermáticas los coeficientes de variación fueron altos, en rangos de 94.4 a 174.5. Los porcentajes de espermatozoides con presencia de gotas proximales citoplasmáticas, el coeficiente de variación de 143.2 fue superior que el 98.0 reportado por Rodríguez (2016). Asimismo, se observó que los coeficientes de variación para el número de espermatozoides normales progresivos motiles por eyaculado y número de dosis para inseminación artificial fueron altos (95.1).

La covariable sesión de colección de semen fue significativa ($p < 0.05$) en 9 de las 27 variables analizadas. Las variables influenciadas por esta covariable fueron ajustadas a una sesión estándar de 7.07. La covariable peso del macho al momento de la colección de semen influyó ($p < 0.05$) en 12 de las 27 variables analizadas, por lo que estas variables fueron ajustadas a un peso estándar de 4090 g.

Los pesos promedios de los conejos mostraron ser diferentes entre tratamientos ($p = 0.003$). Aquellos suplementados con polifenoles de té verde pesaron 4073.3 ± 11.9 g mientras que los conejos controles 4124.6 ± 12.7 g. Estos resultados concuerdan con una disminución de los pesos en conejas suplementadas con té verde (El-Ratel et al., 2017). Reportes en humanos han encontrado que la catequina epigallocatequina-3-galato predominante en el té verde reduce el peso corporal, al disminuir la diferenciación y proliferación de adipocitos durante la lipogénesis (Wolfram, Wang, & Thielecke, 2006). Otros estudios también en humanos han reportado que el té verde inhibe la actividad de enzimas digestivas, disminuyendo la absorción de nutrientes, por lo que el consumo actual de energía se reduce con pérdidas de peso (Huang et al., 2014).

3.3.1. Comportamiento sexual, características seminales y producción espermática

El efecto de tratamiento y orden de eyaculado en el comportamiento sexual, características seminales y en las concentraciones espermáticas son mostradas en el Cuadro 4.

El tiempo de reacción bajo el ritmo de reproducción extensivo utilizado (una colección de semen por semana y dos eyaculados por sesión) fue de 10.7 s. Este valor es superior a los 8.5 s reportado por Fallas-López et al. (2011) en conejos bajo mismo ritmo de reproducción y raza. Valores de 13.1 s de tiempo de reacción han sido registrados en conejos Nueva Zelanda Blanco bajo ritmos semi-intensivos (dos colecciones por semana y dos eyaculados por sesión). La incidencia de presencia de gel registrada de 30% es superior al 24.4% encontrado por Fallas-López et al. (2011). Estos últimos autores reportaron un pH de 7.4, valor ligeramente superior al 7.0 observado en el presente estudio. Rangos de potenciales de hidrógeno entre 6.8 y 7.3 han sido observados en el conejo (Ferrian, 2007). El volumen seminal promedio de 0.60 ml, es consistente al de 0.64 ml reportado para conejos bajo un ritmo de reproducción extensivo (Niza, Di Meo, & Taranto, 2003), pero inferior que 0.99 ml en el mismo ritmo. Valores de volúmenes seminales normales en conejos se sitúan en un rango de 0.3 a 0.9 ml (Boiti et al., 2005). La concentración espermática por ml ($\times 10^6$) obtenida fue de 200.2, valor muy por debajo de 575, 317.3 y 405 millones reportados para ritmos extensivos de reproducción por Bencheikh (1995), Arroita et al. (2000) y Niza, Di Meo y Taranto (2003), respectivamente. Rangos de 90 a 738 para esta última variable han sido documentados (Castellini, Lattaioli, Cardinali, & Bosco, 2006; García-Tomas et al., 2006a, b). El número promedio de espermatozoides por eyaculado ($\times 10^6$) de 128.1 es inferior a los 370 millones reportada por Fallas-López et al. (2011) para la misma raza y ritmo de reproducción extensivo. Los valores de concentración espermática por eyaculado en la presente investigación se encuentran dentro del rango de 90 a 477 millones reportados en la literatura para conejo (Lavara et al., 2010; Quintero-Moreno, 2003). Diferencias en comportamiento sexual y en las características seminales

entre estudios pueden explicarse en términos en diferencias en genotipos, alimentación, condiciones ambientales, manejo, sanidad, protocolos de investigación, así como por el número de muestras.

Cuadro 4. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de tratamiento y orden de eyaculado en el comportamiento sexual, características seminales y producción espermática en conejos.

Característica	Tratamiento		Valor - <i>P</i>	Orden de eyaculado		
	Con Té Verde N = 360	Sin Té Verde N = 316		Primero N = 319	Segundo N = 357	Valor - <i>P</i>
Comportamiento sexual						
Tiempo de reacción (s)*°	10.3 ± 0.49	11.1 ± 0.53	0.227	9.6 ± 0.52 ^a	11.8 ± 0.49 ^b	0.003
Características seminales						
Presencia de gel (%) *	0.31 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.640	0.53 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.02 ^b	0.0001
Volumen (mL)	0.65 ± 0.02 ^a	0.60 ± 0.02 ^b	0.035	0.79 ± 0.02 ^a	0.47 ± 0.02 ^b	0.0001
pH	7.0 ± 0.01	7.0 ± 0.01	0.490	7.0 ± 0.01	7.0 ± 0.01	0.346
Número de espermatozoides /mL (x10 ⁶)	200.9 ± 6.58	202.7 ± 7.04	0.848	227.1 ± 7.01 ^a	176.5 ± 6.61 ^b	0.0001
Número de espermatozoides /eyaculado (x10 ⁶)	137.2 ^a ± 5.64	119.1 ^b ± 6.03	0.029	176.3 ± 6.01 ^a	80.0 ± 5.67 ^b	0.0001

* - Peso al momento de la colección de semen usada como covariable.

° - Orden de sesión progresiva usada como covariable.

^{abc} - Letras con diferentes super-índices en la misma fila son diferentes ($P < 0.05$).

Los conejos suplementados con polifenoles de té verde mostraron tiempos ligeramente menores (-7.8%) para eyacular que los conejos del tratamiento control, pero las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). No se encontraron efectos de tratamiento ($p > 0.05$) en la presencia de gel y pH seminal. Sin embargo, los conejos suplementados mostraron volúmenes seminales superiores (+8.3%; $p = 0.035$) lo que representa un incremento de +0.05 ml. Las razones de esta hiperespermia pudieran estar relacionadas con un mayor tamaño de las vesículas seminales, pero esto no fue determinado. La concentración espermática por volumen de eyaculado en conejos suplementados (137.2 ± 5.64)

fueron superiores (+15.3%; $p=0.029$) a las del grupo control (119.1 ± 6.03), con una ventaja de 18.1 millones de espermatozoides. Estos resultados son consistentes a los incrementos significativos en la concentración espermática observados en ratas al suministrarles extractos de té verde *ad-libitum* al 2 y 5% durante 52 días (Opuwari & Monsees, 2020). Los mecanismos de acción responsables por estos incrementos no son claros y requiere de futuras investigaciones para comprender el impacto de los polifenoles del té verde en las funciones reproductivas de los conejos y en la fertilidad.

Estudios en otras especies han encontrado que incrementos en las concentraciones espermáticas de los eyaculados están correlacionadas con mejoras en la actividad espermatogénica (Adamiak, Kondracki, & Wysokinska 2010; Knecht, Środoń, Szulk, & Duziński, 2013). Aunque en la presente investigación no se realizaron análisis del extracto de las hojas altas en polifenoles, es probable que mejoras en la actividad espermatogénica hayan estado presentes como resultado de la acción antioxidante de las catequinas. Dentro de las catequinas presentes en el té verde se encuentran la epicatequina, epigallocatequina, epicatequina-3-galato y epigallocatequina-3-galato siendo este último el más abundante y con mayor acción antioxidante (Fillippini et al., 2020). Los téis verdes con altos niveles de antioxidantes en humanos han mostrado incrementar la producción de lactato en las células de Sertoli, proporcionando un soporte nutricional para las células germinales en desarrollo en los túbulos seminíferos, lo que favorece la salud reproductiva (Martins et al., 2014). Los tejidos testiculares y el sistema reproductivo de los machos son particularmente susceptibles al estrés oxidativo (Asadi, Bahmani, Kheradmand, & Rafieiankopaie, 2017). Las catequinas han mostrado poseer propiedades antioxidantes que mejoran la concentración, motilidad, morfología y la calidad espermática, así como la tasa de fertilización dada sus capacidades para reducir la producción de especies reactivas de oxígeno (Rahman et al., 2018).

La activación de los leucocitos constituye una fuente importante de producción de especies reactivas de oxígeno, y ha mostrado que afecta negativamente la

concentración espermática (Lackner et al., 2010). El aumento de la concentración espermática por volumen de eyaculado en los conejos suplementados con polifenoles de té verde pudiera estar relacionado a la actividad antioxidante de las catequinas, reduciendo daños de las células espermáticas (Roychoudhury, Agarwal, Virk, & Cho, 2017).

El tiempo de reacción para la obtención del primer eyaculado fue más corto ($p=0.003$; - 22.9%) que el segundo. El orden de eyaculado mostró afectar la incidencia en la presencia de gel, volumen seminal y las concentraciones espermáticas por ml y por eyaculado ($p=0.0001$), similar a lo reportado por Rodríguez-De Lara et al. (2010). Para estas variables, los valores fueron mayores en el primer eyaculado que en el segundo en 381.8, 68.1, 28.7 y 120.4% más, respectivamente. La presencia de gel significativamente mayor en el primer eyaculado se explica por el acúmulo de gel en las glándulas accesorias, ya que en el segundo salto el tiempo de recuperación para la producción de gel es menor (Holtz & Foote, 1978; Sánchez-Rodríguez et al., 2015). En promedio, los primeros eyaculados presentaron 0.32 ml más de volumen seminal y fueron más concentrados en 50.6 y 96.3 millones por ml y por eyaculado que los segundos, respectivamente.

Se encontró un efecto ($p=0.012$) de interacción entre tratamiento y orden de eyaculado para el volumen seminal, como se puede observar en el Cuadro 5. Los volúmenes seminales de los primeros eyaculados de los conejos suplementados con polifenoles de té verde fueron superiores ($p=0.002$) que los primeros eyaculados de los conejos controles (+13.3%), mientras que los volúmenes de los segundos eyaculados para los conejos con o sin suplemento fueron similares. Siempre se observaron diferencias en volúmenes seminales entre el primer y segundo eyaculado para los dos tratamientos ($p=0.0001$), lo cual coincide con lo encontrado por Bencheikh (1993).

Cuadro 5. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para los efectos de interacción entre tratamiento y orden de eyaculado en el volumen seminal en conejos.

Variable	Con Té Verde		Sin Té Verde		Valor-P
	Primero N = 173	Segundo N = 187	Primero N = 146	Segundo N = 170	
Volumen (mL)	0.85 $\pm$ 0.02 ^a	0.46 $\pm$ 0.02 ^c	0.73 $\pm$ 0.03 ^b	0.47 $\pm$ 0.02 ^c	0.012

^{abc} - Letras con diferentes superescritos en la misma fila son diferentes ($P < 0.05$).

3.3.3. Características de motilidad y cinemática de movimiento espermático

En el Cuadro 6 se muestra el efecto de tratamiento y orden de eyaculado en el porcentaje de espermatozoides estáticos, motilidad total, motilidad progresiva, así como en las características de cinemática de movimiento espermático determinados mediante el software CASA.

La motilidad total en el presente estudio fue 82.8%. Este valor es superior al 70.9 y 70.5% reportados por Arroita et al. (2000) y Niza, Di Meo y Taranto (2003), en conejos bajo ritmos de reproducción extensivos, respectivamente. El valor de la presente investigación también mayor que el 71.5% registrado por el sistema CASA con cámaras de 20 Micrones de profundidad (Massányi et al., 2008). El valor promedio obtenido de 54.3% de motilidad progresiva es similar al 56.5% reportado por el mismo autor anterior. Dentro de los parámetros de velocidad espermática individual, la velocidad rectilínea promedio (VSL) correspondió a 89.1 $\mu\text{m/s}$, siendo este valor superior al 31.5 y 35.8 $\mu\text{m/s}$ reportados por Safaa et al. (2008) y Massányi et al. (2008), respectivamente. Estos dos últimos autores reportaron valores de 74.1 y 99.9 $\mu\text{m/s}$ para la velocidad rectilínea (VCL), siendo menores que la velocidad de 188.5 $\mu\text{m/s}$ del presente estudio. El rango entre 72 y 194 para VCL ha sido documentado por varios autores (Castellini et al., 2011; Lavara et al., 2008; Lavara et al., 2010; Lavara et al., 2012; Safaa et al., 2008). La velocidad promedio de trayectoria (VAP) de 110.9 $\mu\text{m/s}$ fue superior a las velocidades de 50.4 y 42.5 $\mu\text{m/s}$ encontradas por Massányi et al. (2008) y Safaa et al. (2008), y muy cercano al límite superior del rango de 36 a 108 (Brun et al., 2006; Ferrian, 2007).

Cuadro 6. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para el efecto de tratamiento y orden de eyaculado en movilidad y cinemática de movimiento espermático en conejos.

Características de movimiento y cinemática espermática	Tratamiento		Valor - <i>P</i>	Orden de eyaculado		Valor - <i>P</i>
	Con Té Verde N = 360	Sin Té Verde N = 316		Primero N = 319	Segundo N = 357	
Espermatozoides estáticos (%) °	18.2 $\pm$ 0.73 ^b	16.1 $\pm$ 0.78 ^a	0.053	16.9 $\pm$ 0.78	17.3 $\pm$ 0.73	0.707
Motilidad total (%) °	81.8 $\pm$ 0.73 ^a	83.9 $\pm$ 0.78 ^b	0.053	83.1 $\pm$ 0.78	82.7 $\pm$ 0.73	0.707
Motilidad progresiva (%) *	55.4 $\pm$ 1.03	53.2 $\pm$ 1.10	0.131	53.8 $\pm$ 1.09	54.8 $\pm$ 1.03	0.534
VSL (μ m/seg) *	89.4 $\pm$ 1.24	88.3 $\pm$ 1.33	0.567	85.9 $\pm$ 1.32 ^b	91.8 $\pm$ 1.24 ^a	0.001
VCL (μ m/seg) *	187.9 $\pm$.86	188.7 $\pm$ 1.99	0.786	183.7 $\pm$ 1.98 ^b	192.9 $\pm$ 1.86 ^a	0.0008
VAP (μ m/seg)	111.1 $\pm$.20	110.1 $\pm$ 1.29	0.572	107.1 $\pm$ 1.28 ^b	114.2 $\pm$ 1.21 ^a	0.0001
LIN (%) *	49.9 $\pm$ 0.53 ^a	48.3 $\pm$ 0.56 ^b	0.043	48.6 $\pm$ 0.56	49.6 $\pm$ 0.53	0.231
STR (%) ^{*°}	80.8 $\pm$ 0.60	79.3 $\pm$ 0.64	0.078	80.0 $\pm$ 0.64	80.1 $\pm$ 0.60	0.953
WOB (%) *	59.9 $\pm$ 0.31 ^a	59.0 $\pm$ 0.33 ^b	0.042	58.9 $\pm$ 0.32 ^b	60.0 $\pm$ 0.31 ^a	0.012
ALH (mm) *	6.9 $\pm$ 0.08 ^b	7.2 $\pm$ 0.08 ^a	0.036	7.0 $\pm$ 0.08	7.1 $\pm$ 0.08	0.157
BCF (Hz) *	39.0 $\pm$ 0.24 ^a	37.1 $\pm$ 0.26 ^b	0.0001	38.2 $\pm$ 0.26	37.9 $\pm$ 0.24	0.522
DSL *	37.8 $\pm$ 0.60 ^a	35.8 $\pm$ 0.64 ^b	0.024	35.3 $\pm$ 0.63 ^b	38.3 $\pm$ 0.60 ^a	0.0007
DCL *	80.2 $\pm$ 0.80	78.1 $\pm$ 0.86	0.082	76.9 $\pm$ 0.85 ^b	81.4 $\pm$ 0.80 ^a	0.0001
DAP	46.9 $\pm$ 0.53 ^a	45.0 $\pm$ 0.57 ^b	0.012	44.2 $\pm$ 0.57 ^b	47.7 $\pm$ 0.53 ^a	0.0001

* - Peso al momento de la colección de semen usada como covariable.

° - Orden progresivo de sesión usada como covariable.

^{abc} - Letras con diferentes superescritos en la misma fila son diferentes ($p < 0.05$).

Para los parámetros de progresividad cinética espermática, el índice de linealidad (LIN) de 49.2% es muy similar al 50.4% reportado por Safaa et al. (2008), pero superior al 36% observado por Massányi et al. (2008), y está dentro del rango de 41 a 59% registrado por Quintero-Moreno (2003). El índice de oscilación o balanceo (WOB) de 59.5% es superior al 51.0% observado por Massányi et al. (2008), e inferior a los índices 66.9 y 67.8% alcanzados por Lavara et al. (2005) y Ferrian (2007), respectivamente. El índice de rectitud (STR) de 80.1% es superior a los registrados por Massányi et al. (2008) y Safaa et al. (2008) con valores de STR de 71 y 69.9%, respectivamente. Con respecto a la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH), el valor de 7.0 μ m es mayor a los 4.48 y 2.35 μ m documentados por Massányi et al. (2008) y Safaa et al. (2008), respectivamente. La frecuencia de golpe cruzado

(BCF), expresada en Hz fue 38.1, valor superior a los 23.8 y 7.3 Hz reportados por Massányi et al. (2008) y Safaa et al. (2008). La distancia de línea recta (DSL), distancia curvilínea (DCL) y distancia promedio de trayectoria (DAP), todas expresadas en Micrones, son raramente incluidas en los trabajos donde consideran la descripción de estos parámetros. Diferencias en los valores para los diferentes parámetros de motilidad y cinética de movimiento mediante el sistema CASA entre estudios pueden estar relacionadas a diferencias en la edad, pesos, genotipo, condiciones ambientales, facilidades de colección de semen y en las metodologías en el procesamiento del semen. Adicionalmente, las diluciones y tipos de cámaras para mediciones (lejas) empleadas en el sistema CASA están relacionadas con su profundidad y características de adhesividad en las superficies de las mismas. Massángy et al. (2008) sugiere que el tipo de cámara de evaluación influye en la fiabilidad de las medidas de los parámetros espermáticos.

De las 14 variables estudiadas relacionadas con la movilidad y cinética de movimiento espermático, ocho fueron influenciadas por el tratamiento ($p < 0.05$). Se encontró un efecto ($p < 0.05$) de tratamiento en el porcentaje de espermatozoides estáticos y motilidad total espermática. Los conejos suplementados con polifenoles de té verde presentaron 13.0% más de espermatozoides estáticos y 2.6% menor motilidad total que los conejos controles. Se encontró una tendencia ($p = 0.131$) de la motilidad progresiva a aumentar en los conejos suplementados (+4.1%).

Dentro de los parámetros de velocidad, expresados en $\mu\text{m/s}$, la velocidad rectilínea espermática (VSL), velocidad curvilínea (VCL) y la velocidad media (VAP) de los espermatozoides no fueron influenciadas ($p = 0.05$) por efecto de tratamiento. No obstante, para los parámetros de progresión se encontró cierta tendencia ($p = 0.078$) en el índice de rectitud (STR) y en la distancia curvilínea (DCL) a incrementar en conejos suplementados con polifenoles de té verde, en un 1.9 y 2.7%, respectivamente.

El tratamiento influyó ($p=0.005$) en el índice de linealidad (LIN), el índice de oscilación (WOB) de las cabezas espermáticas de conejos, la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH), la frecuencia de golpe cruzado (BCF), la distancia de línea recta (DSL) y la distancia promedio de trayectoria (DAP). La suplementación con polifenoles incrementó LIN, WOB, BCF, DSL y DAP en 3.3, 2.5, 5.1, 5.6 y 4.2%, comparados con conejos controles respectivamente. En estos últimos, la ALH fue menor en 4.3%.

Los parámetros de motilidad y cinética determinados por el sistema CASA reflejan una serie de medidas derivadas del análisis del desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo (Valverde y Madrigal-Valverde, 2018) y ha mostrado proveer de información adicional acerca de la capacidad fertilizadora de los espermatozoides del conejo (Lavara et al., 2005). La estimación de parámetros de motilidad y cinética espermática en conejos mediante el CASA han sido correlacionados con la fertilidad (Brun et al., 2002; Ferrian, 2007). La motilidad espermática es considerada como el principal indicador de la calidad del semen para inseminación artificial (Mustofa et al., 2021).

Los incrementos de espermatozoides estáticos y la disminución de la motilidad total en conejos suplementados no son claras, pero pudieran ser explicadas en términos de incrementos en la producción espermática y no como un efecto adverso por la suplementación con polifenoles de té verde. En el presente estudio se encontró una correlación negativa ($r=-0.230$; $p<0.0001$) entre el porcentaje de espermatozoides estáticos y la concentración espermática por eyaculado. A mayor concentración espermática mayor presencia de espermatozoides estáticos. De la misma forma, la motilidad total se correlacionó positivamente ($+0.230$; $p<0.0001$) con la concentración espermática por eyaculado. A mayor concentración espermática los porcentajes de motilidad total se reducen.

Los conejos suplementados con polifenoles de té verde mostraron cierta tendencia ($p=0.131$) de mejora en la motilidad progresiva. El movimiento progresivo mostró estar correlacionada positivamente ($p=0.0001$) con los

siguientes parámetros de velocidad: VCL ($r=+0.164$), VSL ($r=+0.795$) y VAP ($r=+0.431$). Para el caso de los parámetros de progresión, la motilidad progresiva también se correlaciona positivamente ($p=0.0001$) con LIN ($r=+0.760$), WOB ($r=+0.624$) y STR ($r=+0.733$), y negativamente con ALH ($r=-0.397$).

No se encontraron diferencias ($p<0.05$) entre los conejos suplementados con polifenoles de té verde y los controles para los parámetros de velocidades espermática VCL VSL y VAP, los cuales mostraron valores de velocidades altas pero similares. Sin embargo, los parámetros de progresión de movimiento LIN, WOB y STR fueron superiores en los conejos suplementados.

La frecuencia de golpe cruzado de las cabezas de los espermatozoides (BCF), expresada en Hz, en conejos suplementados fue mayor y estadísticamente diferente ($p=0.0001$) del grupo control. Estudios en verracos han mostrado que esta variable está asociada con el patrón de movilidad del flagelo espermático y los entrecruzamientos de las trayectorias curvilíneas y lineales (Sellés et al., 2003), pero que la estimación de este parámetro está correlacionada con el número de imágenes por segundo que se pueden visualizar con el sistema CASA. En el presente estudio, el número de imágenes por segundo fue de 35. Grieblová, Pintus y Ros-Santaella (2017) sostienen que, en verracos las variables VSL, VAP y BCF están asociadas con la integridad de la membrana, por lo que espermatozoides con membranas íntegras podrían promover un movimiento rápido, lo que facilita la progresión del espermatozoide hasta el ovocito.

El contenido de polifenoles contenidos en el extracto de té verde utilizado en el presente estudio fue alto (90%), con un porcentaje de 45% de epigallocatequina. La mejora en la motilidad progresiva coincide con los hallazgos encontrados por Lombardo et al. (2011), quienes al suplementar epigallocatequina en humanos con prostatitis crónica observaron un efecto positivo, asociado con una disminución del estrés oxidativo generado por un proceso inflamatorio, ya que este polifenol tendría efectos antioxidantes frente a la producción de citoquinas y a la enzima COX-2, que acelera la formación de sustancias que causan inflamación. Además, a nivel fisiológico la epigallocatequina ha mostrado inhibir

la proliferación de células T primarias en ratones, lo cual disminuiría el estrés oxidativo por leucoespermia (Wu et al., 2009).

Hatasa et al. (2016) consideran que el tejido testicular es propenso a sufrir por la acción de los radicales libres y por la presencia de un estrés oxidativo, debido a las altas tasas de división celular y consumo de oxígeno, así como a la baja presión de oxígeno, lo que ocasiona un debilitamiento de los vasos sanguíneos y como consecuencia a altos niveles de ácidos grasos insaturados. Además, las propiedades antioxidantes de los polifenoles del té verde pueden estar reduciendo la inflamación y la fragmentación del DNA, incrementando la viabilidad y motilidad seminal (Asadi et al., 2017). La concentración antioxidante de los polifenoles ha mostrado estar correlacionado con los niveles espermáticos y la motilidad (Sreejaya & Nirmala, 2016). Por otro lado, se ha sugerido (Roychoudhury, Agarwal, Virk, & Chak-Lam, 2017) que los altos niveles de ROS, las mutaciones de ADN mitocondrial y el alto nivel de fragmentación de ADN espermático reducen la producción de ATP, por lo que termina afectando la motilidad del espermatozoide; no obstante, los presentes resultados sugieren que existe una disminución en los radicales libres a causa de los polifenoles contenidos en el té verde, por lo que no existe un daño en la mitocondria. Entonces, si la mitocondria no se encuentra dañada, esto puede derivar en un mejor aprovechamiento del ATP por el espermatozoide, lo que termina por mejorar las características de movilidad y cinemática.

Los resultados del presente estudio sugieren que los polifenoles del té verde pudieran estar favoreciendo, por sus capacidades antioxidantes, la integración de las membranas celulares. La peroxidación lipídica provoca la pérdida de la integridad de la membrana, lo cual interrumpe la función celular y daña la motilidad de los espermatozoides al inducir apoptosis (Rahman et al., 2018). El mismo autor reporta que las propiedades antioxidantes del té verde disminuyen la fragmentación de ADN y los procesos inflamatorios aumentando la motilidad espermática.

No se encontraron efectos ($p>0.05$) de orden de eyaculado en las características de movimiento y de cinemática LIN, STR y BCF. Sin embargo, los valores de cinemática de movimiento en los segundos eyaculados fueron superiores ($p<0.05$), dados por incremento en VSL (6.9%), VCL (5.0%), VAP (6.6%), WOB (1.9%), DSL (8.5%), DCL (5.8%) y DAP (7.9%). Además, se observa que la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH) tiende ($p=0.07$) a ser mayor en los segundos eyaculados que los primeros; esta diferencia entre primer y segundo eyaculado se ha encontrado en estudios anteriores, y probablemente se deba al envejecimiento de los espermatozoides (Axnér, Ström, & Linde-Forsberg, 1997).

Ninguna de las características de motilidad y cinemática de movimiento espermático fue influenciada ($p>0.05$) por la interacción entre tratamiento y orden de eyaculado.

3.3.4. Morfología espermática y potencial reproductivo

El efecto de tratamiento y orden de eyaculado en las características morfológicas espermáticas y potencial reproductivo se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Medias de cuadrados mínimos ($\pm$ error estándar) para el efecto de tratamiento y orden de eyaculado en la morfología espermática y potencial reproductivo en conejos Nueva Zelanda Blanco.

Características	Tratamiento		Valor- <i>P</i>	Orden de eyaculado		Valor- <i>P</i>
	Con té verde N = 360	Sin té verde N = 316		Primero N = 319	Segundo N = 357	
<i>Morfología espermática</i>						
Espermatozoides normales (%) °	84.5 ± 0.89	83.9 ± 0.95	0.634	84.0 ± 0.95	84.3 ± 0.90	0.795
Espermatozoides con cola doblada (%) °	5.1 ± 0.43	5.9 ± 0.46	0.237	5.5 ± 0.46	5.5 ± 0.43	0.983
Espermatozoides con cola enrollada (%) °	3.2 ± 0.25	3.2 ± 0.27	0.999	3.1 ± 0.27	3.3 ± 0.26	0.632
Espermatozoides con gota distal (%)	4.9 ± 0.25	5.1 ± 0.27	0.418	5.1 ± 0.26	4.9 ± 0.25	0.471
Espermatozoides con gota proximal (%) °	2.3 ± 0.14 ^a	1.9 ± 0.14 ^b	0.031	2.2 ± 0.14	1.9 ± 0.14	0.156
<i>Potencial reproductivo</i>						

No. de espermatozoides normales motiles progresivos/eyaculado (x10 ⁶) ^o	71.8 ± 3.07	64.3 ± 3.29	0.097	93.1 ± 3.28 ^a	43.1 ± 3.09 ^b	0.0001
Número de dosis para inseminación artificial ^o	14.4 ± 0.61	12.9 ± 0.66	0.097	18.6 ± 0.65 ^a	8.6 ± 0.62 ^b	0.0001

* - Peso al momento de la colección de semen usada como covariable.

^o - Orden de sesión usada como covariable.

^{abc} - Letras con diferentes super-índices en la misma fila son diferentes (P < 0.05).

El porcentaje de espermatozoides anormales en este estudio (15.8%) se encuentra dentro del rango entre 4.0 y 23.5% documentado por varios autores (Quintero-Moreno, Rigau, & Rodríguez-Gil, 2003; Rodríguez, 2016; Vicente et al., 2000), y están de acuerdo que la fertilidad no se ve afectada cuando los porcentajes de anormalidades se sitúan entre el 20 y 25%. Los porcentajes promedios de gotas citoplasmáticas distales y proximales observadas en el presente estudio fueron de 5.0 y 2.1%, respectivamente. La sumatoria de estas anormalidades corresponden a 7.1% que se encuentran ligeramente por debajo del 10.1 para generación de líneas genéticas de conejos (Rodríguez, 2016).

Los porcentajes de espermatozoides normales, con colas dobladas, colas enrolladas y gota distal no fueron influenciados por el tratamiento (p>0.05). Sin embargo, la presencia de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales en conejos suplementados con polifenoles de té verde fue mayor que el tratamiento control (p=0.031; +21.0%). Sin embargo, los mecanismos por los cuales el suplemento aumenta esta anormalidad no son claros y requieren ser investigados.

Las gotas citoplasmáticas distales tienen poca relevancia para la fertilidad; sin embargo, las proximales en altos porcentajes indican una alta inmadurez asociados con falta de maduración durante su paso por el epidídimo, degeneración o hipoplasia testicular (Ferrero, Torretta, & Rabaglino, 2010; Yániz, Soler, & Santolaria, 2015). Estudios han mostrado que los niveles de fertilidad se ven afectadas cuando en las dosis seminales hay presencia de 30% de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales (Rodríguez, 2016).

No se observaron efectos ($p>0.05$) del orden de eyaculado en los porcentajes de colas dobladas, colas enrolladas y de presencia de gotas citoplasmáticas distales. Sin embargo, los primeros eyaculados presentaron una mayor proporción de espermatozoides con colas dobladas que los segundos (+15.6%), aunque las diferencias no fueron significativas ($p=0.156$). Se encontró un efecto ($p=0.0001$) del orden de eyaculado en el potencial reproductivo. Los primeros eyaculados produjeron 50 millones más de espermatozoides normales motiles progresivos por eyaculado (+116.0%), y 10 dosis potenciales más para inseminación que los segundos eyaculados (+116.3%). Las características morfológicas y de potencial reproductivo no mostraron estar afectadas ($p>0.05$) por la interacción entre tratamiento y orden de eyaculado.

Al final, los conejos suplementados con polifenoles de té verde con dosis de 50 mg por kilogramo de peso vivo por día en el agua de bebida durante cinco días antes de la colección de semen produjeron en promedio individual 7.5 millones más espermatozoides normales progresivos motiles (+11.7%) y 1.5 más dosis para uso en inseminación artificial (+11.6%). Esto independientemente que los pesos corporales de los conejos suplementados se hayan visto reducidos. Se requiere mayor número de estudios para determinar si los incrementos en las dosis aquí utilizadas aumentan el comportamiento sexual, la calidad seminal y el comportamiento reproductivo. Además, se requieren también más estudios sobre biodisponibilidad intestinal de los polifenoles de té verde de acuerdo con diferentes dosis y formas de administración, relacionados con la eficiencia reproductiva de conejos machos.

3.4. Conclusiones

Dados los resultados arrojados por el experimento realizado, se pueden obtener una serie de conclusiones que podemos clasificar en dos. El primer grupo refiere aquellas que derivan directamente del contraste teórico con lo observado en los resultados, mientras que el segundo grupo refiere a una prospectiva de la investigación.

La primera conclusión del primer grupo es la notable mejoría en las características seminales (volumen, concentración espermática y motilidad progresiva), así como de la cinemática espermática (LIN, WOB, BCF, DSL, DAP) de los conejos cuyas aplicaciones pueden contribuir significativamente a la innovación en producción cunícola al reducir costos en alimento, enfermedades por hacinamiento e infraestructura, lo que es consistente con el estado de la cuestión del presente trabajo.

La segunda conclusión que podemos derivar de los resultados consiste en que la suplementación de conejos con polifenoles de té verde puede contribuir a superar las condiciones estacionarias críticas de cada año, lo que abona a aumentar la rentabilidad de los negocios cunícolas, puesto que se mantiene constante el canal de producción. Esto es de vital relevancia para la esfera social y económica de los estados productores puesto que los negocios cunícolas han visto con el paso del tiempo reducir su mercado hasta casi desaparecer. Por tanto, esta investigación se alinea con los objetivos de la agenda 2030 de la ONU al contribuir con una base científica en la elaboración de alternativas sostenibles y sustentables para alcanzar la seguridad alimentaria.

La segunda conclusión prospectiva consiste en la literatura citada donde se indica que el té verde puede tener una gran variedad de efectos en los distintos sistemas del organismo, por lo que futuras investigaciones podrían contrastar los efectos del té verde en sistemas como el inmune, cardíaco, renal, nervioso, entre otros más. Otra gran avenida de investigación consiste en estudiar los efectos del té verde en carne de canal para determinar aspectos de calidad, vida de anaquel, etcétera. Además de lo anterior, una línea de investigación, por demás importante, consiste en la dificultad que puede significar para el productor calcular y manipular las dosis para la suplementación, por lo que se requiere innovar, incluso emprender, en las formas de presentación de las dosis para facilitar al productor esta labor.

Finalmente, este estudio se centra en la producción cunícola, sin embargo, la presente investigación da cuenta de la factibilidad de reproducir el mismo

experimento en otras especies de producción, puesto que poco se ha encontrado en la literatura y puede constituir toda otra línea de investigación más amplia.

3.5. Literatura citada

- Adamiak, A., Kondracki, S., & Wysokinska, A. (2010). Influence of season of the year on physical properties of ejaculates from Polish Large White and Polish Landrace boars. *Roczniki Naukowe Zootechniki*, 37, 159-167.
- Agarwal, A., Abdelrazik, H., & Sharma, R. K. (2008) Oxidative stress management in patients with male or female factor infertility. *Handbook of Chemiluminiscent Methods in Oxidative Stress Assessment*, 195.
- Arroita, Z., Falceto M., V., Rillo S., M., De Alba, C., Moreno, C., Ciudad, M., J., & Rafel, O. (2000). Effect of collection frequency on production, quality and storage of young bucks semen. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress*. A, 81-87.
- Asadi, N., Bahmani, M., Kheradmand, A., Rafieiankopaie, M. (2017). The impact of oxidative stress on testicular function and role of antioxidants in improving it: A review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11:IE01.
- Axnér, E., Ström, B., & Linde-Forsberg, C. (1997). Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology*, 47, 929- 934.
- Bencheikh, N. (1995). Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez le lapin. *Annales de Zootechnie*, 44, 263-279.
- Bencheikh, N. (1993). Production de sperme et fertilité du mâle *Oryctolagus cuniculus*. Effets de la fréquence de récolte et du type génétique. Thèse Doctorat Institut National. *Polytechnique de Toulouse*, 142 p.
- Boiti C., Castellini C., Theau-Clement M., Besenfelder, U., Liguori, L., Renieri, T., & Pizzi, F. (2005). Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Science*, 13, 71-91.
- Brun, J. M., Theau-Clément, M., & Bolet, G. (2002). The relationship between semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 70, 139-149.
- Cabrera, C., Giménez, R., & López, M. C. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4427- 4435. doi:10.1021/jf0300801
- Castellini, C. Lattaioli, P. Cardinali, R., & Dal Bosco, A. (2006). Effect of collection rhythm on spermatozoa and droplet concentration of rabbit semen. *World Rabbit Science*. <https://doi.org/10.4995/wrs.2006.551>

- Castellini, C., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., & Collodel, G. (2011). What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility*, 96, 24-27.
- Cruz-Bacab, L. E., Ramírez-Vera, S., Vázquez-García, M. C., & Zapata-Campos, C. C. (2018). Reproducción de conejos bajo condiciones tropicales, efectos negativos y posibles soluciones. *CienciaUAT*, 13(1), 135-145. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.989>
- Das, S. K., & Karmakar, S. N. (2015). Effect of green tea (*Camellia sinensis* L.) leaf extract on reproductive system of adult male albino rats. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 7(4), 178-184.
- El-Ratel, I., Abdel-Khal, A., El-Harairy, M., Fouda, S. F., & El-Bnaw, L. Y. (2017). Impact of green tea extract on reproductive performance, hematology, lipid metabolism and histogenesis of liver and kidney of rabbit does. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 12(2), 51-60. <https://doi.org/10.3923/ajava.2017.51.60>
- Fallas-López, M., Rodríguez-De Lara, R., Bárcena-Gama, R., Sánchez-Torres Esqueda, M. T., Hernández-Sánchez, D., Martínez-Hernández, P. A., & Aguilar-Romero, O. (2011). Rabbit sexual behavior, semen and sperm characteristics when supplemented with sprouted wheat. *Animal Reproduction Science*, 129(3-4), 221-228. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.12.009
- Filippini, T., Malavolti, M., Borrelli, F., Izzo, A., Fairweather-Tait, S. J., Horneber, M., & Vinceti, M. (2020). Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3, CD005004. DOI: 10.1002/14651858.CD005004.pub3.
- Ferrero, S., Torretta, M. E., & Rabaglino, M. B. (2010). Caracterización cuali-cuantitativa de patologías espermáticas estudio comparativo de la incidencia de anomalías espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(12),1-20.
- Ferrian, S. (2007). Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación. Trabajo final de Master. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Filippini, T., Malavolti, M., Borrelli, F., Izzo, A.A., Fairweather-Tait, S.J., Horneber, M., & Vicenti, M. (2020). Green tea (*Camellia sinensis*) for the prevention of cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2;3(3): CD005004.
- García-Tomas, M., Sanchez, J., Rafael, O., Ramon, J., & Piles, M. (2006a). Heterosis, direct and maternal genetic effects on semen quality traits of rabbits. *Livestock Science*, 100, 111-120.
- García-Tomas, M., Sanchez, J., Rafael, O., Ramon, J., & Piles, M. (2006b). Variability, repeatability and phenotypic relationship of several characteristics of production and semen quality in rabbits. *Animal Reproduction Science*, 93, 88-100.

- Grieblová, A., Pintus, E., & Ros-Santaella, J. L. (2017). Integrity of head and tail plasmalemma is associated with different kinetic variables in boar sperm. *Animal Reproduction Science*, 184, 218-227. <https://doi.org/10-1016/j.anirepisci.2017.07.020>
- Thorne, H. (2013). Guía de Hardware HT-IVOS Versión 1.5 HT CASA II. Software Manual Version, Serial number 10576.
- Hashem, N., El-Hady, A., & Hassan, O. (2013). Effect of vitamin E or propolis supplementation on semen quality, oxidative status and hemato-biochemical changes of rabbit bucks during hot season. *Livestock Science*, 157(2-3), 520-526. doi: 10.1016/j.livsci.2013.09.003
- Hatasa, Y., Chikazawa, M., Furuhashi, M., Nakashima, F., Shibata, T., Kondo, T., ... & Uchida, K. (2016). Oxidative deamination of serum albumins by (-)-Epigallocatechin-3-O-Gallate: A potential mechanism for the formation of innate antigens by antioxidants. *Plos ONE*, 11(4). doi:10.1371/journal.pone.0153002
- Holtz, W., & Foote, H. (1978). Composition of rabbit semen and the origin of several constituents. *Biology of Reproduction*, 18, 286-292.
- Huang, J., Wang, Y., Xie, Z., Zhou, Y., Zhang, Y., & Wan, X. (2014). The anti-obesity effects of green tea in human intervention and basic molecular studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1-13.
- Kim, S., Lee, M. J., Hong, J., Li, C., Smith, T. J., Yang, G. Y., Seri, D., & Yang, C. S. (2000). Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols. *Nutrition and Cancer*, 37(1), 41-48. doi:10.1207/s15327914nc3701_5
- Knecht, D., Środoń, S., Szulk, K., & Duziński, K. (2013). The effect of photoperiod on selected parameters of boar semen. *Livestock Science*, 157(1), 364-371.
- Lackner, J. E., Agarwal, A., Mahfouz, R., du Plessis, S. S., & Schatzl, G. (2010). The association between leukocytes and sperm quality is concentration dependent. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), 12. doi:10.1186/1477-7827-8-12
- Lavara, R., Vicente, J. S., & Baselga, M. (2012). Estimation of general parameters for semen quality traits and growth rate in parental rabbit line. *Theriogenology*, 78, 567-575.
- Lavara, R., Vicente, J. S., & Baselga, M. (2011). Genetic parameters estimates for semen production traits and growth rate of parental rabbit line. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128, 44-51.
- Lavara, R., Baselga, M., & Vicente, J. S. (2010). Aneuploidy in rabbit males: Semen traits and fertility. *Theriogenology*, 74, 105-110.

- Lavara, R., Vicente, J., Marco-Jiménez, F., & Baselga, M. (2008). Correlation between CASA and ASMA parameters in rabbit semen. *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress*, 9, 381-386.
- Lavara, R., Mocé, E., Lavara, F., De Castro M., P. V., & Vicente, J. S. (2005). Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology*, 64, 1130-1141.
- Lavara, R., Moce, E., & Vicente, J. (2003). Buenas prácticas en inseminación artificial I. *Lagomorfa*, 128, 14–23.
- Lombardo, F., Fiducia, M., Lunghi, R., Marchetti, L., Palumbo, A., Rizzo, F., ... & Gandini, L. (2011). Effects of a dietary supplement on chronic pelvic pain syndrome (Category IIIA), leucocytospermia and semen parameters. *Andrologia*, 44, 672–678. doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01248.x
- Martins, A. D., Alves, M. G., Bernardino, R. L., Dias, T. R., Silva, B. M., & Oliveira, P. F. (2014). Effect of white tea (*Camellia sinensis* (L.)) extract in the glycolytic profile of Sertoli cell. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53(6): 1383-91.
- Massányi, P., Chrenek, P., Lukác, N., Makarevich, A. V., Ostro, A., Zivcak, & Bulla, J. (2008). Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. *Slovak Journal of Animal Science*, 41, 60-66.
- Mosbah, R., Yousef, M., & Mantovani, A. (2015). Nicotine-induced reproductive toxicity, oxidative damage, histological changes and haematotoxicity in male rats: The protective effects of green teaextract. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(3), 253-259. doi: 10.1016/j.etp.2015.01.001
- Mocé, E., Lavara, F., & Vicente, J. S. (2000). Effect of reproductive rhythm on seminal parameters from a rabbit line selected for growth. *World Rabbit Science*, 24, 47–53.
- Mustofa, I., Susilowati, S., Wurlina, W., Hernawati, T., & Oktanella, Y. (2021). Green tea extract increases the quality and reduced DNA mutation of post-thawed Kacang buck sperm. *Heliyon*, 7(3), e06372. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06372
- Niza, A., Di Meo, C., Taranto, S., & Stanco, G. (2002). Effect of collection frequency on rabbit semen production. *World Rabbit Science*, 10(2), 49-52.
- Niza, A., Di Meo, C., & Taranto, S. (2003). Effect of Collection Rhythms and Season on Rabbit Semen Production. *Reproduction in Domestic Animals*, 38: 436-439.
- NOM-062-ZOO-1999. (2001). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. 22 de agosto de 2001.

- Opuwari, C., & Monsees, T. (2020). Green tea consumption increases sperm concentration and viability in male rats and is safe for reproductive, liver and kidney health. *Scientific Reports*, 10, 15269.
- Paál, D., Krocková, J., L'Ondruska, Slanina, T., Strejcek, F., & Massányi, P. (2014). Effect of semen collection frequency on the progress in the motility of rabbit spermatozoa. *Slovak Journal of Animal Science*, 47(2), 61-67.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. (2007). Multivariate cluster analysis regression procedure as tools to identify motile sperm subpopulation in rabbit semen fertility and litter size. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 312-319.
- Quintero-Moreno, A. (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Rahman, S., Huang, Y., Zhu, L., Feng, S., Khan, I., Wu, J., & Wang, X. (2018). Therapeutic role of green tea polyphenols in improving fertility: A review. *Nutrients*, 10(7), 834. doi:10.3390/nu10070834
- Rodríguez, C. M. (2016). Efecto de la selección por ganancia diaria durante el engorde sobre la calidad espermática en conejo. Tesis de Master. Universidad Politécnica de Valencia.
- Rodríguez-De Lara, R., Fallas-López, M., García-Muniz, J. G., Martínez-Hernández, P. A., Rangel-Santos, R., Maldonado-Siman, E., & Cadena-Meneses, J. A. (2015) Sexual behavior and seminal characteristics of fertile mature New Zealand White male rabbits of different body weights. *Animal Reproduction Science*, 152, 90-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.005>
- Rodríguez-De Lara, R., Fallas-López, M., García-Muñiz, J. G., Martínez-Hernández, P. A., Rangel-Santos, R., & Maldonado-Siman, E. (2010). Sexual behavior and seminal characteristics of fertile mature New Zealand White male rabbits of different body weights. *Animal Reproduction Science*, 152, 90-98.
- Rodríguez-De Lara, R., Noguez-Estrada, J., Rangel-Santos, R., García-Muñiz, J., Martínez-Hernández, P., Fallas-López, M., & Maldonado-Siman, E. (2010). Controlled doe exposure as biostimulation of buck rabbits. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 270-275. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.09.002
- Roychoudhury, S., Agarwal, A., Virk, G., & Cho, C. L. (2017). Potential role of green tea catechins in the management of oxidative stress-associated infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 34(5), 487–498. doi:10.1016/j.rbmo.2017.02.006
- Safaa, H. M., Vicente, J. S., Lavara, R., & Viudes, M. P. (2008). Semen evaluation of two selected lines of rabbit bucks. *World Rabbit Science*, 16, 141 – 148.

- Sánchez-Rodríguez, A., Masdeu, M., García-García, R. M., Arias-Álvarez, M., Lorenzo, P. L., & Rebollar, P. G. (2015). Descripción de los parámetros seminales del conejo ibicenco. *XVI Jornadas sobre Producción Animal*, Tomo II, 352-354.
- SAS (2016). PROC MIXED. Version 14.2 [Software]: Obtenido de Universidad Autónoma Chapingo.
- Sellés, E., Gadea, J., Roman, R., Matás, C., & Ruiz, S. (2003). Analysis of *in vitro* fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 38(1), 66-72. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00406.x>.
- Sreejaya, P., & Nirmala P. (2016) Efficacy of zeta potential as an effective sperm selection method for ICSI in smokers and obese patients. *Journal of Infertility Reproductive Biology*, 4(2), 40-44.
- Valverde, A., & Madrigal-Valverde, M., (2018). Sistemas de análisis computarizados de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 9(2), 469-484.
- Valverde, A., & Madrigal-Valverde, M. (2019). Evaluación de cámaras de recuento sobre parámetros espermáticos de verracos analizados con un sistema CASA-Mot. *Agronomía Mesoamericana*, 447-458. doi: 10.15517/am.v30i1.34145
- Vicente, J., Viudes de C., M., Lavara, R., & Lavara, F. (2000). Effect of male line on prolificacy from does inseminated with low sperm doses. *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress*, 8, 273-277.
- Walton, A. (1945). The Technique of Artificial Insemination. Imperial Bureau Anim. Genetics. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Wolfram, S., Wang, Y., & Thielecke, F. (2006). Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50,176-187.
- Wu, D., Guo, Z., Ren, Z., Guo, W., & Meydani, S. N. (2009). Green tea EGCG suppresses T cell proliferation through impairment of IL-2/IL-2 receptor signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(5), 636–643. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.001
- Yániz, J. L., Soler, C., & Santolaria, P. (2015). Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Animal Reproduction Science*, 156, 1–12. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.002
- Yousef, M., Abdallah, G., & Kamel, K. (2003). Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, 76(1-2), 99-111. doi: 10.1016/s0378-4320(02)00226-9
- Zanchi, M. M., Manfredini, V., Brum, D., Vargas, L. M., Spiazzi, C. C., Soares, M. B., ... & Santos, F. W. (2015). Green tea infusion improves

cyclophosphamide-induced damage on male mice reproductive system.
Toxicology Reports, 2, 252-260. doi: 10.1016/j.toxrep.2014.12.016

4. APÉNDICES

Apéndice 1. Configuración del sistema CASA.

Límites de análisis	Valor
Porcentaje mínimo de motilidad	0
Porcentaje mínimo de motilidad progresiva	0
Calibración	
Objetivo	Zeiss 10x CM-040GE:
Magnificación del objetivo X	1.2
Magnificación del objetivo Y	1.2
Cámara	
Exposición (Ms)	16
Integrado habilitado	Verdadero
Tiempo integrado	1000
Detección de células	
Elongación máxima (%)	100
Elongación mínima (%)	1
Mínimo brillo de la cabeza espermática	153
Tamaño máximo de la cabeza	91
Tamaño mínimo de la cabeza	4
Filtro estático de la cabeza	Falso
Brillo mínimo de la cola	255
Desplazamiento automático del brillo mínimo de la cola	10
Modo de brillo mínimo de la cola	Manual
Cámara espermática	
Correcciones capilares	1.3
Profundidad de la cámara (µm)	20
Tipo de cámara	Capilaridad
Iluminación	
Tipo de iluminación	Fluorescencia
Intensidad de la fluorescencia	3996
Intensidad visible	2953
Fotómetro máximo	90
Fotómetro mínimo	70

Apéndice 2. Configuración sistema CASA para cinemática de movimiento espermático.

Cinemática	Ajuste
Índice de rectitud (STR) progresiva (%)	80
Velocidad promedio de trayectoria (VAP) progresiva ($\mu\text{m/s}$)	50
VAP lento ($\mu\text{m/s}$)	20
Velocidad rectilínea (VSL) lenta ($\mu\text{m/s}$)	30
Algoritmo estático	Largo
VAP estático ($\mu\text{m/s}$)	4
VSL estático ($\mu\text{m/s}$)	1
Multiplicador de ancho estático	0.5
Morfología	
Intervalo de confianza del Reflejo de la pieza media distal (DMR) (%)	25
DMR Máximo de la gota a la cola (μm)	5
DMR Longitud máxima de la cola (μm)	20
Intervalo de confianza de las gotas (%)	20
Distancia mínima de gota distal (μm)	4
Largo de la cabeza gota proximal (μm)	10.5
Largo mínimo de la cola (μm)	0
Largo promedio angular de la cola doblada	5
Tasa mínima de doblamiento angular	5
Intervalo de confianza de las colas dobladas (%)	50
Angulo mínimo de la cola enrollada ($^{\circ}$)	180
Intervalo de confianza de la cola enrollada (%)	50
Intervalo de confianza de la cola (%)	75
Estado	
Estado de temperatura	37
Categoría Viadent	
Esperma viable fluorescencia	Viable
Captura de video	
Velocidad del marco de captura (Hz)	1
Conteo del marco	30