



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**EL USO DE EXTRACTO DE  
6-METHOXY-2-BENZOXAZOLINONE COMO  
BIOESTÍMULO REPRODUCTIVO EN CONEJOS**

M.C. MARIANELLA FALLAS LÓPEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

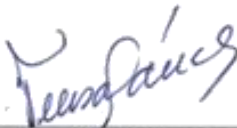
MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO


2016

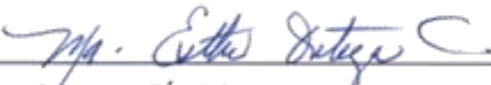
La presente tesis titulada: El uso de extracto de 6-Methoxy-2-benzoxazolinone como bioestímulo reproductivo en conejos, realizada por la alumna Marianella Fallas López bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

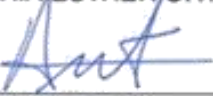
**DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

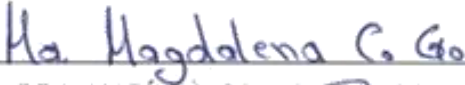
**CONSEJO PARTICULAR**

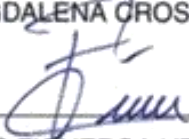
CONSEJERA:   
DRA. MARÍA TERESA SÁNCHEZ-TORRES ESQUEDA

DIRECTOR  
DE TESIS:   
DR. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

ASESORA:   
DRA. MARÍA ESTHER ORTEGA CERRILLA

ASESOR:   
DR. PEDRO ARTURO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

ASESORA:   
DRA. MARÍA MAGDALENA CROSBY GALVÁN

ASESOR:   
DR. JOSÉ LUIS FIGUEROA VELASCO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Marzo de 2016

# EL USO DE EXTRACTO DE 6-METHOXY-2-BENZOXAZOLINONE COMO BIOESTÍMULO REPRODUCTIVO EN CONEJOS

Marianella Fallas López, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2016

## RESUMEN

Los germinados de gramíneas contienen el compuesto fenólico no estrogénico 6-methoxy-2-benzoxazolinone (6-MBOA) que estimula la reproducción de mamíferos herbívoros pequeños. El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la administración del extracto puro de 6-MBOA en el comportamiento sexual y en la calidad del semen de conejos. Veintidós conejos Nueva Zelanda Blanco, adultos, fértiles, de 24 meses de edad, se asignaron aleatoriamente a uno de dos tratamientos: 1) Sin 6-MBOA; 2) Con una dosis de 0.167 mg de 6-MBOA kg<sup>-1</sup> peso corporal, durante 3 días antes de la colección de semen. El diseño experimental fue completamente al azar con 11 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue el macho. Se llevaron a cabo dos fases de alrededor de 6 semanas cada una. En la primera fase se inyectó 6-MBOA vía subcutánea mientras que en la segunda fase la ruta de administración fue intramuscular. El grupo testigo recibió un placebo. La colección de semen se realizó dos veces por semana con dos eyaculaciones por sesión. Los resultados incluyen un análisis estadístico independiente por fase (1 y 2), uno global y uno comparativo de las vías de aplicación del 6-MBOA (subcutáneo e intramuscular). En general, no se encontraron efectos entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) pero si entre la primera y segunda eyaculación ( $p \leq 0.05$ ) para tiempo de reacción, volumen, osmolaridad y concentración por mililitro; y entre vías de aplicación ( $p \leq 0.05$ ) para volumen, pH, osmolaridad, presencia colas dobladas y enrolladas, y presencia de gota distal. La interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculado fue significativa ( $p \leq 0.05$ ) para el tiempo de reacción, el pH, la concentración espermática por mililitro y colas dobladas; el 6-MBOA disminuyó la presencia de colas dobladas en los espermatozoides y al aplicarlo vía subcutánea aumentó la libido en la segunda eyaculación.

**Palabras clave:** Conejos machos, 6-MBOA, análisis de semen.

# USE OF EXTRACTS 6-METHOXY-2-BENZOXAZOLINONE AS REPRODUCTIVE BIOSTIMULATION IN RABBITS

Marianella Fallas López, Dr.  
Colegio de Postgraduados, 2016

## ABSTRACT

Sprouted grass contains a non-estrogenic phenolic compound 6-methoxy-2-benzoxazolinone (6-MBOA) which stimulates reproduction in small mammalian herbivorous. The objective of the present study was to determine the influence of the administration of 6-MBOA pure extract on sexual behavior and semen quality in rabbits. New Zealand White mature fertile rabbits ( $n=22$ ) twenty-four months of age were randomly assigned to one of two treatments: 1) without 6-MBOA; 2) with a dose of 0.167 mg of 6-MBOA  $\text{kg}^{-1}$  body weight given during three days before semen collection. The experimental design was a completely randomized with 11 replicates per treatment, the experimental unit was one buck. There were two phases in the experiment lasting 6 weeks each phase. In the first phase rabbits were subcutaneously injected with 6-MBOA whereas in the second phase the administration was intramuscularly. Control group received a placebo. Semen collection was twice a week with two ejaculations in each session. Results include independent statistical analysis by phase (1 and 2), one global and one comparative on of the ways of application of 6-MBOA (subcutaneous and intramuscular). Overall, there were no effects between treatments ( $p > 0.05$ ) but effects between the first and second ejaculation were found ( $p < 0.05$ ) for reaction time, volume, osmolarity and concentration per milliliter; and between application routes ( $p < 0.05$ ) for volume, pH, osmolarity, bent and curled tails presence and presence of distal drop. The interaction between treatment and ejaculate order was significant ( $p < 0.05$ ) for reaction time, pH, and sperm concentration per milliliter and for the presence of bent tails; 6-MBOA decreased the presence of sperm bent tails and when applied subcutaneously increased libido in the second ejaculation.

**Keywords:** rabbit males, 6-MBOA, semen analysis

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por estar siempre a mi lado.

Agradezco a mi familia: Dr. Raymundo Rodríguez De Lara mi esposo, amigo, guía, colega y director de tesis gracias por confiar y apoyarme siempre. A mis hermosos y amados hijos Elizabeth y Adrián por el amor, comprensión, apoyo incondicional y su infinita tolerancia. A mis papás, hermanos y suegro por el apoyo sin medida.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por las facilidades otorgadas para realizar mis estudios, principalmente al área de Ganadería y los profesores y equipo de apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo económico otorgado para el desarrollo y conclusión de mis estudios

A mi Consejera Dra. María Teresa Sánchez-Torres por todo el apoyo, confianza y consejos.

A mis Asesores por sus valiosas aportaciones y apoyo constante.

A mis amigos la Dra. Dulce Ávila, Eduardo Ramírez, Lic. Otilio Aguilar, Herlinda Córdova, sus hijas por su amistad y apoyo incondicional.

Al Dr. Julio Huerta y la Dra. Carolina Saint-Pierre del Centro de Investigación en Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) por su ayuda en conseguir la semilla.

A Juan Galicia por apoyarnos durante tantos años en el trabajo diario.

## CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	JUSTIFICACIÓN .....	3
1.2	OBJETIVO .....	3
1.2.1	Objetivos específicos.....	3
1.3	HIPÓTESIS .....	4
1.3.1	Hipótesis específicas.....	4
2	REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1	6-METHOXY-2-BENZOXAZOLINONE (6-MBOA) .....	5
2.1.1	Descubrimiento, definición, estructura y otras particularidades.....	5
2.1.2	Usos del 6-MBOA en reproducción .....	6
2.1.3	Otros usos del 6-MBOA.....	12
2.2	EL MACHO .....	13
2.2.1	Espermatogénesis y producción de semen.....	13
2.2.2	Factores que afectan el comportamiento reproductivo y la calidad del semen del conejo.....	15
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1	LOCALIZACIÓN.....	18
3.2	ANIMALES, TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL .....	18
3.3	PREPARACIÓN DE INYECCIONES .....	19
3.4	PROTOCOLO DE COLECCIÓN Y ANÁLISIS DE SEMEN.....	20
3.5	MEDIO AMBIENTE E INSTALACIONES .....	19
3.6	NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN.....	19
3.7	VARIABLES DE RESPUESTA.....	20
3.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
4	RESULTADOS.....	23
4.1	FASE 1: INYECCIÓN DE TRATAMIENTOS SUBCUTÁNEAMENTE .....	23
4.2	FASE 2: INYECCIÓN DE TRATAMIENTOS INTRAMUSCULAR .....	26
4.3	COMPARACIÓN FASE 1 VS FASE 2 COMPLETO:.....	30
4.4	COMPARACIÓN DE APLICACIÓN DE 6-MBOA (SUBCUTÁNEA vs INTRAMUSCULAR).....	34
5	DISCUSIÓN .....	38
6	CONCLUSIONES .....	44
7	LITERATURA CITADA.....	45

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

<b>Figura 1.</b> Estructura del 6-MBOA y de la melatonina .....	9
<b>Cuadro 1.</b> Estadísticos descriptivos para peso de los conejos, libido y características seminales .....	23
<b>Cuadro 2.</b> Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$ error estándar) para el efecto del uso de 6-MBOA y el orden de eyaculación en la libido y las características seminales en conejos Nueva Zelanda Blanco .....	25
<b>Cuadro 3.</b> Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$ error estándar) para el efecto de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculación sobre el tiempo de reacción, la concentración espermática total y la presencia de las colas dobladas. ....	26
<b>Cuadro 4.</b> Estadísticos descriptivos para peso de los conejos, libido y características seminales. ....	27
<b>Cuadro 5.</b> Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$ error estándar) para el efecto del uso de 6-MBOA inyectado intramuscularmente y el orden de eyaculado en la libido y las características seminales en conejos Nueva Zelanda Blanco.....	29
<b>Cuadro 6.</b> Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$ error estándar) para el efecto de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculación sobre el pH y la concentración espermática total por mililitro.....	30
<b>Cuadro 7.</b> Estadísticos descriptivos para peso de los conejos, libido y características seminales.....	31

**Cuadro 8.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto del uso de 6-MBOA y el orden de eyaculación en la libido y las características seminales en conejos Nueva Zelanda Blanco..... 32

**Cuadro 9.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculación sobre el tiempo de reacción, la concentración espermática total (mL y eyaculación) y la presencia de las colas dobladas.  
..... 34

**Cuadro 10.** Estadísticos descriptivos para peso de los conejos, libido y características seminales..... 35

**Cuadro 11.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto del uso de 6-MBOA inyectado intramuscularmente y el orden de eyaculado en la libido y las características seminales en conejos Nueva Zelanda Blanco..... 36



## 1 INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica establecida en granjas cunícolas comerciales la cual ha facilitado el mejoramiento genético y las garantías sanitarias, que además permite disminuir los costos de manejo (Dimitrova *et al.*, 2009). Sin embargo, en la cunicultura como en otras especies la reproducción está afectada por efectos multifactoriales englobados en tres aspectos principales: el manejo, la nutrición y el ambiente (Boiti, 2004; Theau-Clément, 2007; Szendrő *et al.*, 2012; Theau-Clément *et al.*, 2015; Menchetti *et al.*, 2015) .

Existen alternativas naturales que permiten mejorar la reproducción, una de ellas es el uso de germinados de gramíneas, ya que son una buena alternativa en alimentación animal, especialmente en la producción cunícola donde el precio del alimento comercial es elevado y muchas veces no se tiene mucho espacio ni los recursos para producir forraje de calidad con el cual disminuir costos. Adicional a esto, Poole (1960) descubrió que al inicio de la primavera, con el consumo de los primeros brotes de gramíneas se estimulaba la actividad reproductiva de los conejos silvestres, posteriormente se encontró que los germinados mejoran el desarrollo gonadal en diferentes especies de *Microtus* en el norte de América (Nelson y Biota, 1993). Este efecto estimulante se ha relacionado con el 6-methoxy-2-benzoxazolinone (6-MBOA) que se encuentra en germinados de gramíneas (Sanders *et al.*, 1981).

Experimentalmente se demostró que el 6-MBOA ejerce efecto estimulante intenso en la reproducción de hembras y machos de *Microtus montanus* (Berger *et al.*, 1981; Sanders *et al.*, 1981; Schadler *et al.*, 1988). La mayor parte de los estudios con 6-MBOA

y la evaluación de sus efectos en la reproducción se han realizado en hembras. Varios autores no han encontrado efecto del 6-MBOA al aplicarlo en machos de otras especies de *Microtus sp.* (Berger *et al.*, 1981, Nelson y Shiber, 1990) y en hámsteres (Anderson *et al.*, 1988; Urbanski *et al.*, 1990). Sin embargo, Cranford (1983) observó que el 6-MBOA inyectado intraperitonealmente incrementó el tamaño de las vesículas seminales y los testículos. Boyd y Bray (1989) utilizaron implantes subcutáneos de 6-MBOA en conejos machos salvajes y obtuvieron el mismo patrón de regresión testicular seguido de un crecimiento de los testículos cuando se implantó melatonina o se expusieron los conejos a días cortos y concluyeron que el 6-MBOA tiene propiedades análogas a la melatonina y no son una simple imitación sino que también puede actuar en un nivel más complejo de control neuroendocrino en la temporada de reproducción. También en conejos machos se encontró que al suplementar con germinados de trigo durante épocas críticas (otoño e invierno), se mejoró la viabilidad espermática y se redujeron las anomalías de los espermatozoides (Fallas-López *et al.*, 2011). Los estudios del efecto de este compuesto en conejos son escasos y es necesaria más información sobre formas de administración de 6-MBOA y su efecto en la reproducción. Por lo que el propósito de este trabajo fue comprobar que el 6-MBOA causa un efecto favorable en la reproducción, como lo demostró Grobner *et al.* (1987) al inyectar dosis de 6-MBOA en conejas.

## **1.1 JUSTIFICACIÓN**

Se realizaron trabajos de laboratorio y de campo con la finalidad de demostrar el beneficio de utilizar extracto de 6-MBOA en la reproducción en conejos, buscando una mejora en la libido, y en las características seminales, para incrementar el potencial reproductivo y la eficiencia de un programa de IA y así obtener un gran beneficio para los cunicultores, reduciendo costos al mejorar la producción y mantenerla estable durante todo el año.

## **1.2 OBJETIVO**

Analizar el efecto del 6-MBOA en el control de la reproducción en conejos en diferentes vías de administración.

### **1.2.1 Objetivos específicos**

- i. Determinar el efecto del uso de 6-MBOA en la libido y la calidad del semen en conejos.
- ii. Demostrar cual es la mejor vía de administración del 6-MBOA.

### **1.3 HIPÓTESIS**

El uso de extracto de 6-MBOA administrado en diferentes formas y concentraciones mejora el comportamiento reproductivo en conejos.

#### **1.3.1 Hipótesis específicas**

- i. El 6-MBOA mejora la calidad del semen en conejos y el tiempo de reacción a la monta.
- ii. Las diferentes vías de administración del 6-MBOA pueden afectar la respuesta reproductiva de los conejos.

## 2 REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 6-METHOXY-2-BENZOXAZOLINONE (6-MBOA)

#### 2.1.1 Descubrimiento, definición, estructura y otras particularidades

Negus y Berger (1977) observaron una correlación entre la actividad reproductiva del ratón de campo y el inicio del crecimiento de los recursos alimenticios vegetales. Experimentos de campo y laboratorio confirmaron la existencia de un factor en las plantas inmaduras que incrementaba la fertilidad y el comienzo de la actividad reproductiva de los ratones; el compuesto se identificó como 6-methoxy-2-benzoxazolinone (6-MBOA), el cual es un metabolito secundario producido por la planta como un factor de resistencia a insectos, hongos, etc. (Wahlroos y Virtanen, 1958). Tang *et al.* (1975) encontraron que las plantas jóvenes de cereales, principalmente maíz, trigo, centeno y hojas inmaduras de una planta ornamental llamada lágrima de Job (*Coix lacryma jobi* L.) presentan mayores concentraciones de 6-MBOA.

El consumo de pastos de gramíneas en crecimiento al inicio de la primavera demostró estimular la actividad reproductiva en conejos silvestres europeos (Poole, 1960) y ratones de campo (Pinter y Negus, 1965; Negus y Berger, 1977). La asociación entre el consumo de germinados en primavera y la estimulación reproductiva en ratones de campo dio como resultado el aislamiento del 6-MBOA, compuesto fenólico no estrogénico (Berger *et al.*, 1981; Sanders *et al.*, 1981) que se encuentra en forraje tierno (Sanders *et al.*, 1981). El 2,4- dihidroxy-7-methoxy-2-H-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona (DIMBOA), es el precursor del 6-MBOA, y es particularmente abundante como glucósido en plantas jóvenes de gramíneas. Cuando la planta sufre alguna alteración motivada por

algún agente externo (de tipo infeccioso o algún predador) se presenta una rápida conversión del DIMBOA a 6-MBOA (Berger *et al.*, 1981), de esta forma, actúa como una defensa biológica natural contra el barrenador del maíz, bacterias, hongos u otros insectos (Wahlroos y Virtanen, 1958).

### **2.1.2 Usos del 6-MBOA en reproducción**

Los primeros estudios sobre 6-MBOA se realizaron para explicar la relación entre fotoperiodo, temperatura, nutrición y eficiencia reproductiva en animales silvestres, principalmente en el ratón de campo de Montana (*Microtus montanus*), ya que cuando estos animales consumen plantas herbáceas inmaduras es indicativo del comienzo de la reproducción en la época de disponibilidad de alimento. Pinter y Negus (1965) encontraron que cuando se incluye gramíneas en estado inmaduro en la dieta de ciertos herbívoros pequeños, existe una profunda influencia sobre la actividad reproductiva. Así como la estación de crecimiento, la maduración gradual y la eventual pérdida de humedad son paralelas a una reducción del comportamiento reproductivo, por lo que la cantidad de forraje inmaduro y fresco está aparentemente, ligada a la estimulación de las características reproductivas.

Se demostró que la ingestión de germinados de gramíneas mejora el desarrollo gonadal en diferentes especies de *Microtus* en el norte de América, Negus y Berger (1977) ofrecieron en invierno forraje verde de trigo como suplemento por dos semanas a ratones *Microtus montanus* y encontraron que todas las hembras estaban gestantes mientras que las hembras del grupo testigo (sin suplemento) no quedaron gestantes y lo atribuyeron al forraje; el germinado de trigo contiene 6-MBOA (Epstein *et al.*, 1986) y

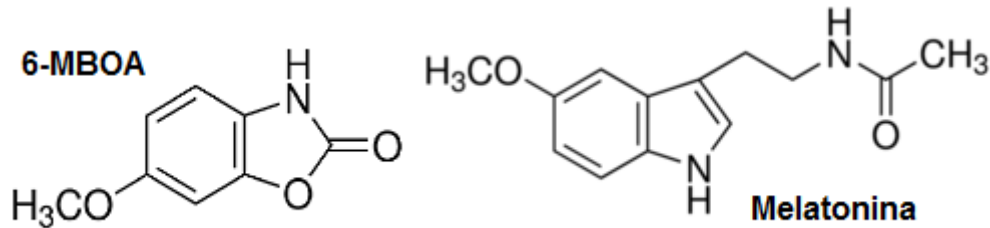
cuando se proporciona a hembras de ciertas especies estacionales de días largos durante el invierno, se estimula el desarrollo ovárico y uterino independientemente del fotoperiodo corto y las bajas temperaturas (Negus y Berger, 1977; Epstein *et al.*, 1986; Korn y Taitt, 1987; Schadler *et al.*, 1988). Estudios en conejas, han demostrado que la suplementación con germinados de trigo como fuente de 6-MBOA durante 6 días antes de la inseminación artificial mejora las tasas de receptividad sexual y el tamaño de la camada al parto, inclusive durante períodos críticos estacionales (Rodríguez-De Lara *et al.*, 2007). Sin embargo, en machos de diferentes especies de roedores, la administración de 6-MBOA no ha mostrado la misma respuesta que en las hembras (Korn y Taitt, 1987; Anderson *et al.*, 1988; Vaughan *et al.*, 1988).

Al ofrecer germinados hidropónicos de trigo como fuente de 6-MBOA a conejas por seis días antes de la inseminación artificial (IA), se encontró una tasa de receptividad 28% más alta ( $P = 0.001$ ) con respecto al grupo testigo, las camadas fueron más grandes ( $7.7 \pm 0.30$  vs  $6.8 \pm 0.32$ ) y hubo un incremento en el número de gazapos nacidos acumulados ( $P = 0.02$ ), con respecto al grupo testigo durante todo el periodo de prueba ( $28.1 \pm 1.2$  vs  $23.6 \pm 1.3$ , respectivamente) (Rodríguez De Lara *et al.*, 2007). De acuerdo a estos autores los resultados pueden explicarse en términos de que el 6-MBOA pudiera estar actuando a nivel del complejo hipotálamo-hipófisis, directamente en el ovario o posiblemente podría inducir una mayor sensibilidad de la glándula pituitaria al GnRH favoreciendo el desarrollo folicular ovárico y el proceso de ovulación como lo reportan Butterstein y Schadler (1988), quienes demostraron que al remover la glándula pituitaria se elimina el efecto estimulante del 6-MBOA y que al implantar 6-MBOA combinado con FSH se estimula el desarrollo folicular y se incrementa la ovulación .

En 1981 Berger *et al.* aislaron el compuesto 6-MBOA, lo proporcionaron rolando en avena a *Microtus montanus* y obtuvieron un peso testicular mayor y en hembras un mayor peso uterino y una alta proporción de hembras gestantes. Korn y Taitt (1987) también demostraron que cuando los ratones *Microtus* consumieron 6-MBOA se aceleró la reproducción en época invernal; Butterstein *et al.* (1985) implantaron por 3 días 6-MBOA o aplicaron una inyección subcutánea de 6-MBOA en ratas y encontraron un aumento en el peso del útero y en el ovario por un mayor número de cuerpos lúteos, también encontraron más FSH en el suero. Schadler *et al.* (1988) además implantaron 6-MBOA en *Microtus* y encontraron un 40% más de FSH en el suero y un incremento significativo en el peso del ovario y del útero poniendo en evidencia que esta sustancia interactúa con la pituitaria para estimular la reproducción en ratones. Nelson y Shiber (1990) implantaron 6-MBOA por tres días en ratas caseras adultas y encontraron que en días cortos se estimuló el crecimiento del útero, pero si se exponían a un tratamiento de 8 semanas con 6-MBOA se reducía la masa del ovario y del útero con respecto a ratas que no se les implantó 6-MBOA o estaban expuestas a días largos.

Algunas investigaciones de la vía fisiológica del 6-MBOA en *Microtus m.* indican que el sitio de acción del 6-MBOA es a nivel neuroendocrino (Sanders *et al.*, 1981); pero no hacen referencia al modo de actuar de dicho compuesto. Por lo que, aunque el mecanismo exacto de acción del 6-MBOA no ha sido determinado, se especula que por la naturaleza de su estructura similar a la melatonina, puede ser que se interrelacionen (Figura 1).





**Figura 1.** Estructura del 6-MBOA y de la melatonina (Sigma-Aldrich, 2016a, Sigma-Aldrich, 2016b)

La melatonina se sintetiza y libera en la glándula pineal, se inhibe por la luz y se estimula por la oscuridad (Wuttke, 1993), por su parte el fotoperíodo impulsa los ciclos de reproducción estacional en muchas especies de mamíferos, la secreción nocturna de melatonina a partir de la glándula pineal se prolonga en los animales mantenidos en fotoperíodos cortos y la duración del impulso de la melatonina regula las funciones reproductivas.

El 6-MBOA estimula más la síntesis de melatonina por la noradrenalina ya que concentraciones mayores a 20  $\mu$ M estimulan la actividad de la serotonina N-acetiltransferasa en la glándula pineal de las ratas y actúa post-sinápticamente sobre el beta receptor; por lo que la asociación progonadal con el consumo de plantas que tienen 6-MBOA se puede deber a que los altos niveles de melatonina inducidos por el 6-MBOA causan una desensibilización de los receptores de la melatonina o a que el 6-MBOA es un antagonista al nivel del receptor de la melatonina, por lo que hay una reestructuración del efecto de inhibición de ésta sobre el sistema reproductivo (Yuwiler y Winters, 1985; Daya *et al*, 1990).

El mecanismo de acción de la melatonina intracelularmente implica una disminución de calcio intracelular  $[Ca^{2+}]_i$  en los gonadotrofos; la melatonina inhibe la GnRH inducida por la liberación del  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, así como flujo de  $Ca^{2+}$  a través de canales sensibles al voltaje. También inhibe la acumulación de GnRH inducida por cAMP, lo que puede dar lugar a la disminución de la afluencia de  $Ca^{2+}$ , porque cAMP, actuando a través de la proteína quinasa A, estimula la afluencia de  $Ca^{2+}$  en las gonadotrofos (Vanecek, 1999).

Grobner *et al.* (1987) mencionaron que la melatonina tiene un efecto inhibitorio en la ovulación de las conejas y que el 6-MBOA estimula la reproducción, lo cual puede deberse a tres posibles mecanismos: 1) el 6-MBOA funciona como antagonista de la melatonina compitiendo con los sitios receptores y al unirse el 6-MBOA reduce la respuesta de la melatonina; 2) el 6-MBOA puede confundir a los sistemas de regulación hormonales y provocar una disminución en la secreción de melatonina, actuando como un retroalimentador negativo para la melatonina por lo que esta no exhibe las propiedades antigonadotrópicas; o 3) el 6-MBOA es agonista de la melatonina, o sea tendría un efecto similar a la melatonina, ya que en conejos la exposición prolongada a la melatonina elimina la respuesta inhibitoria.

La melatonina tiene un papel modulador en la expresión y síntesis de la hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH), la cual es un neuropéptido hipotalámico ampliamente distribuido en el cerebro, así como en la pituitaria para regular la liberación de gonadotropina. Ésta tiene una estrecha asociación con las células que expresan otros neuropéptidos reproductivos tales como las neuronas GnRH y Kisspeptina, también está implicada en varias funciones reproductivas y no reproductivas, tales como

comportamientos socio-sexuales, la regulación del apetito, y la respuesta al estrés. En especies de mamíferos, la GnIH se expresa en las células de Leydig, espermatogonias y espermatocitos; reduce la proliferación de células germinales y la supervivencia, pero aumenta la apoptosis con una reducción de la síntesis de la testosterona en los testículos, además suprime el comportamiento sexual (Ogawa y Parhar, 2014).

Específicamente en conejas, se ha encontrado que inyectando intraperitonealmente  $0.167 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal por tres días se incrementó el peso del ovario ( $593.3 \pm 84.0 \text{ g}$  vs  $347.5 \pm 84.0 \text{ g}$  del testigo) posiblemente por el mayor número de folículos antrales. El peso del útero también fue mayor al del testigo ( $16.09 \pm 1.57 \text{ g}$  vs  $4.56 \pm 1.57 \text{ g}$ , respectivamente), la examinación histológica del útero mostró cambios extensivos en el epitelio luminal, incluida hipertrofia endometrial y proliferación de tejido glandular, probablemente por el estímulo del estrógeno liberado por los folículos antrales. Además, se incrementó la libido (por la frecuencia de montas y la lordosis) (Grobner *et al.*, 1987).

Boyd y Bray (1989) implantaron melatonina a un grupo de conejos y a otro grupo 6-MBOA, y encontraron que ambos tratamientos mostraron un patrón muy similar: una regresión testicular seguida de un recrecimiento o crecimiento compensatorio, como cuando los conejos se exponen a fotoperiodos cortos o a melatonina, esto muestra al 6-MBOA como análogo de la melatonina, y fortalece lo que demostraron Yuwiler y Winters (1985): que el 6-MBOA tiene su sitio de acción en la glándula pineal y que puede estimular la biosíntesis de melatonina. La conclusión de Boyd y Bray (1989) fue que el efecto negativo del fotoperiodo y del peso corporal no es tan marcado en conejos de granja como en conejos silvestres, ya que los animales confinados estabulados se

encuentran en condiciones más controladas, por lo que el 6-MBOA juega un papel más complejo que una simple mímica de la melatonina.

En conejos machos cuando se ofrecieron germinados hidropónicos de trigo como fuente de 6-MBOA por cuatro días consecutivos antes de la colección de semen se mejoró la calidad del mismo ya que el porcentaje de espermatozoides vivos normales fue 13.5 %, más alto que el grupo testigo ( $P = 0.02$ ) ( $62.9 \pm 1.8$  vs  $55.4 \pm 1.8$ ) y también se observó una reducción en el porcentaje de espermatozoides vivos anormales ( $P = 0.0001$ ;  $14.5 \pm 1.8$  vs  $20.9 \pm 1.8$ ) (Fallas-López *et al.*, 2011). Las variaciones morfológicas de los espermatozoides están relacionadas con las secreciones de las glándulas sexuales (León *et al.*, 1991) y la viabilidad con los andrógenos presentes mientras los espermatozoides están madurando en el epidídimo (Alvariño, 2000). Los problemas de viabilidad y las anomalías del semen están asociados a la pérdida de fertilidad y a la eficiencia reproductiva (Porcelli *et al.*, 1984).

### **2.1.3 Otros usos del 6-MBOA**

Actualmente, el 6-MBOA se puede producir sintéticamente, y se utiliza para controlar artrópodos, especialmente la larva de *Diabotica* spp. El 6-MBOA, se añade a formulaciones de insecticidas granulares para atraer a las larvas de gusano de la raíz del maíz a partir de una distancia en el suelo, matándolos en el sitio del gránulo, lo que permite un mejor control de insectos. La atracción de las larvas al gránulo se puede lograr con significativamente menos insecticida y se aplica una gama más amplia de insecticidas mucho menos tóxicos. Además, los niveles reducidos de insecticida en el suelo circundante fortalecerán a los organismos benéficos del suelo, incluyendo

nemátodos depredadores y otros agentes de control biológico que ayudan en el control de larvas de Diabrotica. (US Patent 5112843, 1992).

Como hasta ahora se ha visto el 6-MBOA puede tener acciones en el eje hipotálamo hipófisis pineal (PHPA), como agonista de la melatonina y en los receptores de las células  $\alpha$  o  $\beta$ -adrenérgicas. Estas propiedades pueden ser consideradas para indicar efectos psicotrópicos deseables en los seres humanos como consecuencia de la administración de 6-MBOA. Mientras que la melatonina exagera los síntomas de disforia en las personas deprimidas, el 6-MBOA, como un agonista de la melatonina, funciona de manera contraria y en realidad estimula un mejor estado de ánimo. El mejorar el estado de ánimo normalmente implica que los niveles de serotonina son mayores, este aumento en el nivel de serotonina puede generar una sensación de saciedad actuando en humanos como supresores del apetito, pérdida de peso, potenciadores del estado de ánimo y de la terapia adyuvante para la artritis, apnea del sueño, fibromialgia, diabetes y la hiperglucemia (US Patente 75413556, 2009).

## **2.2 EL MACHO**

### **2.2.1 Espermatogénesis y producción de semen en conejos**

Alrededor del día 85 de vida del macho se presenta el desarrollo completo de la espermatogénesis, aunque hasta el día 115 aparecen los primeros espermatozoides en el epidídimo (Alvariño, 2000); el proceso normal de la espermatogénesis en conejos dura alrededor de 49 días (Lavara, 2009). El semen es una mezcla de espermatozoides, y plasma seminal que se producen en los testículos, secretado en diferentes partes por las

glándulas accesorias y por el epidídimo, las cuales se combinan al momento de la eyaculación (Castellini, 2008).

En el conejo el plasma seminal contiene otras partículas de diferentes tamaños (0.5 – 6  $\mu\text{m}$  de diámetro) llamadas gránulos (Zaniboni *et al.*, 2004). Estas partículas son principalmente colesterol, que inhibe que el acrosoma reaccione anticipadamente y tocoferol, que actúa como antioxidante, por lo que estos gránulos modulan el proceso de capacitación y la reacción acrosomal del espermatozoide, la cinética del semen, la respuesta inmune, así como el tránsito en el tracto femenino (Castellini, 2008).

El éxito en la fertilización se relaciona más con la calidad espermática, la morfología y el porcentaje de espermias con acrosomas intactos (Zhang *et al.*, 1998). Las diferencias en morfología espermática se atribuyen a las variaciones en las actividades secretoras de las glándulas accesorias (León *et al.*, 1991) y las diferencias en la viabilidad espermática se asocian a los niveles de andrógenos producidos por los testículos durante el tiempo que las células permanecen en el epidídimo durante la maduración (Alvariño, 2000).

Los espermatozoides llevan a cabo el proceso de maduración durante el paso por el epidídimo. En esta etapa juegan un papel primordial las secreciones epididimarias, ya que permiten que los espermatozoides condensen el acrosoma, eliminen su gota citoplasmática, y adquieran motilidad y cierta capacidad fecundante (Pérez-Sánchez *et al.*, 1996).

En la raza Nueva Zelanda Blanco, el volumen de semen varía entre 0.3 y 0.6 mL y la concentración espermática de 50 a 500  $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  (Battaglini *et al.*, 1992; Alvariño,

2000). Generalmente el pH se encuentra en valores neutros (6.9 a 7.1) (Theau-Clément *et al.*, 2015).

### **2.2.2 Factores que afectan el comportamiento reproductivo y la calidad del semen del conejo**

En conejos, los estímulos ambientales tales como el fotoperiodo, la temperatura o la alimentación afectan a los animales por estrés. Otros factores propios del animal como el genotipo, la edad, el peso y la sanidad pueden modificar positiva o negativamente el comportamiento reproductivo (Amann y Lambiase, 1967; Alvariño, 2000; Theau-Clément, 2000; Castellini, 2008).

Uno de los objetivos de los centros de inseminación artificial y las granjas comerciales es producir un gran número de dosis de semen con una buena fertilidad y a bajos costos. El ambiente, el manejo, la fisiología, los factores genéticos entre otros, afectan el proceso normal de espermatogénesis, la función espermática y la fertilidad del macho (Mocé *et al.*, 2000; Rodríguez-De Lara *et al.*, 2008).

Las características individuales y genéticas causan variabilidad en el comportamiento y calidad del semen. En Europa cuentan con líneas genéticas muy especializadas y dentro de ellas se encuentran diferencias aunque se mantengan en ambientes similares (Theau-Clément *et al.*, 2003; Viudes de Castro *et al.*, 2004; Brun *et al.*, 2006); con mayor razón se presentan variaciones entre razas en volumen, motilidad y concentración espermática (Alvariño, 2000).

Los conejos domésticos se pueden reproducir durante todo el año, siempre y cuando las condiciones medio ambientales sean favorables, pero se pueden observar

patrones estacionales de reproducción tanto en machos como en hembras. La reproducción es máxima en primavera y mínima en verano (Hulot y Matheron, 1981). En un experimento donde se analizó el comportamiento de casi 2000 machos por cinco años se observaron las siguientes diferencias ( $P \leq 0.001$ ): en primavera es cuando se obtiene mayor volumen del eyaculado (0.56 mL); en otoño se observó la mayor motilidad progresiva (42.6) al igual que la mayor linearidad (40.8 %) y mayor velocidad promedio (93  $\mu$ /s). Por otra parte, en verano se presentó la menor motilidad (59.3%) y la menor concentración ( $467 \times 10^6$  espermatozoides por mL). Verano es la estación con valores espermáticos menores, seguido por invierno aunque en esta estación no se presentaron diferencias significativas (Theau-Clément *et al.*, 2015).

La edad del macho también influye en las características seminales tanto en calidad como en cantidad (Gogol *et al.*, 2002). Los mejores resultados en libido, volumen, pH, concentración y motilidad se obtienen entre los 5 y 24 meses (Luzi *et al.*, 1996; Minelli *et al.*, 1999); animales adultos de alrededor de un año presentan mayor volumen y concentración (0.52 mL y  $654 \times 10^6$  espermatozoides por mL, respectivamente) (Theau-Clément *et al.*, 2015). Conforme avanza la edad disminuye la calidad del semen sobre todo por daños estructurales en la cromatina (Gogol *et al.*, 2002).

Una práctica común y muy recomendada es trabajar con los conejos jóvenes una vez a la semana y con adultos dos veces a la semana, y así obtener dos eyaculaciones por día de trabajo con intervalos de no más de 15 minutos entre ellas, esto mejora las características seminales en calidad y cantidad (Mocé *et al.*, 2000; Castellini, 2008). Si se colecta semen en lapsos mayores de 14 días se disminuye el estímulo sexual, posiblemente por la reducción de andrógenos, mientras que colectas muy frecuentes



semanalmente afectan la producción de semen y la concentración de gránulos (Castellini, 2008). Además, se presentan diferencias entre la primera y la segunda eyaculación, porque a pesar de que la segunda eyaculación presenta el menor volumen y concentración (1.1 mL y  $150 \times 10^6$  espermatozoides mL<sup>-1</sup> menos con respecto a la primera eyaculación) ésta tiene un mayor porcentaje de espermatozoides progresivos, una mayor linealidad y mayor velocidad (Theau-Clément *et al.*, 2015).

Con respecto al manejo, si se mantiene una dieta balanceada, un buen estado sanitario y una luminosidad constante (16 h Luz: 8 h oscuridad), se puede obtener un buen comportamiento reproductivo y buenas características seminales (Castellini, 2008).

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LOCALIZACIÓN**

El estudio se realizó en las instalaciones de Conejos Centro de Investigación Científica del Estado de México A.C., localizado en San Miguel Coatlinchán, Texcoco, Estado de México a 19' 27" N, 98' 53" O y 2220 m sobre el nivel del mar. La temperatura media anual 15.9 °C y 645 mm de lluvias anuales. El trabajo de investigación se inició la primera semana de agosto y finalizó la cuarta semana de octubre del 2015.

#### **3.2 ANIMALES, TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Conejos Nueva Zelanda Blanco adultos (n=22), fértiles, de 24 meses de edad y peso promedio de 3.734 kg  $\pm$  244.9 g se asignaron aleatoriamente a uno de dos tratamientos: 1) sin 6-MBOA (testigo); 2) con una dosis de 0.167 mg kg<sup>-1</sup> peso vivo de 6-MBOA durante tres días antes de la colección de semen. El diseño experimental fue completamente al azar con 11 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue el conejo. Se realizaron dos fases experimentales con una duración de seis semanas cada una. En la primera fase los machos se inyectaron subcutáneamente con 6-MBOA mientras que en la segunda fase la ruta de administración fue intramuscular, la diferencia entre fases fue de una semana en la cual se dejó descansar a los machos. El grupo sin 6-MBOA (testigo) recibió un placebo (agua salina inyectable). La colección de semen en las dos fases se realizó dos veces por semana con dos eyaculaciones en un día de trabajo.

### **3.3 MEDIO AMBIENTE E 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 regulables. Los mismos se mantuvieron individualmente en jaulas metálicas galvanizadas de 90 cm de largo por 30 cm de ancho por 40 cm de alto dispuestas en un sistema *flat-deck* o en línea. Cada jaula provista con un comedero tolva tipo inglés con capacidad de un kilogramo y medio y bebedero automático tipo tetina.

### **3.4 NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN**

A los conejos se les proporcionaron en promedio 180 g diarios de alimento comercial peletizado (Conejina N de Cargill®) con 17.4 % de proteína cruda, 5.3 % de grasa, 15.0 % de fibra cruda, 8.0 % de cenizas, 44.2 % de extracto libre de nitrógeno, 1.2% calcio, 0.7 % fósforo, 2608 kcal de energía digestible kg<sup>-1</sup> y con 10.1 % de humedad.

### **3.5 PREPARACIÓN DEL 6-MBOA**

El 6-MBOA® (Sigma-Aldrich Química S. de R.L. de C.V., México) se disolvió en propilenglicol al 97 % a 40 °C y posteriormente se diluyó en solución salina obteniendo una mezcla final de 95 % solución salina: 5 % propilenglicol. La dosis se ajustó en promedio a 0.5 mL, se aplicó una inyección diaria de alrededor de 0.5 mL con 0.167 mg 6-MBOA kg<sup>-1</sup> peso corporal durante tres días antes de la colecta de semen. Durante la fase 1 se aplicó la inyección por vía subcutánea y en la fase 2 se inyectó por vía intramuscular.

### **3.6 PROTOCOLO DE COLECCIÓN Y ANÁLISIS DE SEMEN**

Se realizaron dos colectas de semen por semana durante 6 semanas; cada día de trabajo se extrajeron dos eyaculaciones por macho, la segunda inmediatamente después de la primera. Para la extracción se utilizó el método de Walton (1945) por medio de una vagina artificial a 42° C y con una coneja de apoyo, se midió el volumen con tubos colectores graduados, se colocó en baño María a 35° C se diluyó 1:5, 50 µL de semen en 250 µL de solución salina fosfatada (Dulbecco A; Oxoid Inc., UK), posteriormente se diluyó con la tinción Viadent (Hoechst 33258) 1:1, 100 µL de la dilución de semen con 100 µL de Viadent. Una alícuota ( $\pm 3$  µL) de la dilución con Viadent se analizó con el sistema de análisis de semen computarizado (CASA IVOS II, v 1.7, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA). La muestra se incubó por 2 min a 37 °C dentro del IVOS II en una Leja de 20 micrones de profundidad con cuatro cámaras para análisis cada una, se obtuvo la concentración espermática, la motilidad, la morfología, y la viabilidad de los espermatozoides. La tinción Viadent contiene bisBenzimida Triclorhidrato y utiliza luz fluorescente para determinar el número de células no viables ya que sólo se tiñen las células que no tienen las membranas intactas.

La osmolaridad se determinó empleando el equipo Osmomat 3000 (Gonotec GmbH), se midió 50 µL del semen diluido con la solución salina fosfatada.

### **3.7 VARIABLES DE RESPUESTA**

El tiempo de reacción (en segundos) fue el intervalo entre la introducción de la hembra al momento que inicia la eyaculación; para medirlo se utilizó un cronómetro. Si

el semen presentaba gel, se removió para proceder a medir el volumen con los tubos colectores graduados.

El resto de las variables se midieron con el sistema CASA: motilidad total, motilidad progresiva, concentración espermática total ( $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ), concentración espermática por eyaculado ( $\times 10^6$ ), viabilidad espermática, colas dobladas, colas enrolladas, gota citoplasmática proximal y gota citoplasmática distal; para esto se contaron al menos 400 espermatozoides por muestra. Con excepción de la concentración espermática total, estas variables se expresaron en porcentaje.

### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron análisis estadísticos independientes para las fases 1 y 2 y un análisis global que incluyó las fases 1 y 2 juntas. Todas las variables medidas se analizaron bajo el modelo que incluyó el efecto del tratamiento (sin y con 6-MBOA) y el orden de eyaculación; se realizó un análisis de varianza utilizando el siguiente modelo lineal mixto:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + E_j + M_k + (T * E)_{ij} + b_1(X_{ijkl} - X) + b_2(X_{ijkl} - X) + e_{ijkl}$$

dónde  $\mu$  es la media total;  $T_i$  es el efecto fijo del *iésimo* tratamiento ( $i = \text{sin, con 6MBOA}$ );  $E_j$  es el efecto fijo del *jésimo* eyaculación ( $j = \text{primera, segunda}$ );  $M_k$  es el efecto aleatorio del *késimo* macho ( $k = 1, \dots, 18$ ; cuatro machos se eliminaron del análisis)  $\sim \text{NI}(0, \sigma_i^2)$ ;  $(T * E)_{ij}$  el efecto fijo de la interacción entre tratamiento y orden de eyaculación;  $b_1$  es el coeficiente de regresión lineal de la covariable sesión de colección de semen y  $b_2$  es

la covariable de peso corporal de los machos al momento de la colección de semen, y  $e_{ijkl}$  es el efecto residual  $\sim NI(0, \sigma_e^2)$ .

También se realizó un análisis en el que los grupos testigo de las fases 1 y 2 se eliminaron con la finalidad de analizar el efecto de la ruta de administración de 6-MBOA. Todas las variables medidas se analizaron bajo el modelo que incluyó el efecto fijo de la forma de administración de 6-MBOA (subcutánea e intramuscular), el efecto fijo del orden de eyaculación (primero y segundo), el efecto fijo de la interacción entre ruta de administración y orden de eyaculación y los coeficientes de regresión lineal de la sesión de colección y peso corporal de los machos al momento de la colección de semen.

Todos los análisis de varianza realizados se hicieron con los datos originales y transformados. Las variables en porcentaje se transformaron en arco seno, el tiempo de reacción y la concentración espermática se transformaron a log 10. Las covariables que no tuvieron un efecto significativo ( $p > 0.05$ ) se eliminaron del modelo y el análisis se realizó otra vez. Los análisis de varianza dieron los mismos patrones de respuesta cuando se utilizó la información transformada y la original. Los resultados del análisis de varianza se presentan con la información original.

Las medias de los efectos principales y la interacción significativa de primer orden se calcularon por mínimos cuadrados. Los cálculos estadísticos se hicieron con SAS (2004) PROC MIXED y LSMEANS. Las medias se compararon con la prueba de Tukey.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 FASE 1: APLICACIÓN DE TRATAMIENTO VÍA SUBCUTÁNEA

La información de cuatro machos, dos por tratamiento, se eliminó porque no terminaron el experimento debido a problemas sanitarios. Los demás machos estuvieron sanos durante todo el experimento. Se realizaron 360 colectas de semen; del total de colecciones realizadas para los dos tratamientos el número de evaluaciones fue de 318 (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Estadísticos descriptivos para peso de los conejos, libido y características seminales

Variable	N	Promedio	DE*	Mínimo	Máximo	CV**
Peso de machos a la colección (g)	360	3767.1	231.2	3310.0	4310.0	6.14
Tiempo de reacción (s)	360	12.6	14.18	1.60	137.2	112.26
Volumen (mL)	318	0.44	0.27	0.05	1.60	60.79
Presencia de Gel (%)	318	0.05	0.23	0.00	1.00	421.45
pH	318	7.28	0.47	6.00	9.00	6.48
Osmolaridad (mOsmol kg <sup>-1</sup> )	318	308.97	12.48	244.0	341.0	4.04
Motilidad total (%)	318	72.08	24.16	0.00	100.00	33.52
Motilidad progresiva (%)	318	37.49	19.17	0.0	84.70	51.12
Concentración espermática total (× 10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	318	346.83	291.59	3.84	1606.12	84.07
Concentración espermática por eyaculado (× 10 <sup>6</sup> )	318	144.20	147.61	0.77	885.58	102.37
Viabilidad espermática (%)	318	89.76	9.23	27.30	100.00	10.28
Colas de espermatozoides dobladas (%)	318	5.33	4.58	0.0	32.0	86.03
Colas de espermatozoides enrolladas (%)	318	3.49	3.85	0.0	36.40	110.28
Gota citoplasmática distal (%)	318	7.24	4.69	0.0	26.30	64.77
Gota citoplasmática proximal (%)	318	9.73	8.90	0.0	64.60	91.44

\*DE = desviación estándar, \*\*CV = coeficiente de variación (%).

Se encontró un efecto de covariable lineal de orden de sesión ( $p \leq 0.05$ ) para el tiempo de reacción y la osmolaridad. La libido fue ajustada a una sesión de colección estándar de 5.5, y la osmolaridad ajustada a una sesión de colección estándar de 5.6. Asimismo se observó un efecto de covariable lineal de peso corporal a la colección de semen ( $p \leq 0.05$ ) para la motilidad progresiva, viabilidad espermática, y espermatozoides con colas enrolladas. También hubo efecto de las covariables lineales de sesión y peso corporal ( $p \leq 0.05$ ) para la motilidad y para los espermatozoides con colas. Estas características espermáticas se ajustaron a una sesión de colección estándar de 5.6 y/o a un peso estándar de 3767 g (Cuadro 2).

No se encontraron efectos ( $p > 0.05$ ) de tratamiento sobre el tiempo de reacción, volumen, motilidad, motilidad progresiva, concentración espermática total, viabilidad espermática, ni para las anomalías (colas dobladas, gota citoplasmática distal ni proximal), aunque se observó una tendencia ( $p \leq 0.1$ ) en cuanto a la presencia de espermatozoides con colas enrolladas las cuales presentaron un 37.2 % menos cuando se aplicó 6-MBOA. Sin embargo, si se observan los resultados de forma global los valores de las variables analizadas se inclinan a favor del 6-MBOA.

Con respecto al orden de eyaculación se encontró un efecto altamente significativo ( $p \leq 0.0001$ ) sobre el volumen (55.8 % mayor en la primera eyaculación) y sobre la concentración espermática por eyaculado (78.2 % mayor en el segunda eyaculación).

También hay efecto significativo del orden de eyaculación ( $p \leq 0.05$ ) sobre el tiempo de reacción (4.5 segundos menos la primera eyaculación), la osmolaridad (1.1 % menor en la primera eyaculación) y la viabilidad espermática (3.4 % mayor en la segunda eyaculación).



**Cuadro 2.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto de 6-MBOA y el orden de eyaculación en la libido y las características seminales en conejos Nueva Zelanda Blanco

Variable	Tratamiento			Eyaculación		
	Testigo	Con 6-MBOA	Valor <i>P</i>	Primera	Segunda	Valor <i>P</i>
N	182	178		180	180	
Tiempo de reacción (s) <sup>a</sup>	13.41 $\pm$ 1.33	11.86 $\pm$ 1.35	0.4224	10.37 $\pm$ 1.19a	14.90 $\pm$ 1.19b	0.0016
N	174	149		148	175	
Volumen (mL)	0.41 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.05	0.2068	0.55 $\pm$ 0.04a	0.35 $\pm$ 0.04b	$\leq$ 0.0001
Presencia de Gel (%)	0.04 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.02	0.4775	0.08 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	0.0826
pH	7.26 $\pm$ 0.04	7.31 $\pm$ 0.05	0.4912	7.32 $\pm$ 0.04	7.25 $\pm$ 0.04	0.1750
N	171	147		147	171	
Osmolaridad (mOsmol kg <sup>-1</sup> )	308.71 $\pm$ 1.05	308.99 $\pm$ 1.14	0.8599	307.11 $\pm$ 1.06a	310.60 $\pm$ 0.97b	0.0082
Motilidad (%) <sup>ab</sup>	68.47 $\pm$ 3.13	73.36 $\pm$ 3.28	0.2776	69.34 $\pm$ 2.52	72.48 $\pm$ 2.43	0.0945
Motilidad progresiva (%) <sup>b</sup>	37.76 $\pm$ 4.43	38.10 $\pm$ 4.49	0.9541	38.70 $\pm$ 3.51	37.16 $\pm$ 3.47	0.3047
Concentración espermática por eyaculado ( $\times 10^6$ )	335.76 $\pm$ 41.57	345.98 $\pm$ 43.04	0.8641	245.07 $\pm$ 34.45b	436.68 $\pm$ 32.93a	$\leq$ 0.0001
Concentración espermática total ( $\times 10^6$ mL <sup>-1</sup> )	140.50 $\pm$ 15.13	147.40 $\pm$ 16.16	0.7582	138.52 $\pm$ 14.41	149.38 $\pm$ 13.31	0.5148
Viabilidad espermática (%) <sup>b</sup>	89.31 $\pm$ 1.81	90.06 $\pm$ 1.8	0.4162	88.26 $\pm$ 1.42b	91.12 $\pm$ 1.40a	0.0005
Colas de espermatozoides dobladas (%) <sup>b</sup>	6.00 $\pm$ 0.66	4.44 $\pm$ 0.68	0.1089	5.29 $\pm$ 0.54	5.16 $\pm$ 0.52	0.7793
Colas de espermatozoides enrolladas (%) <sup>b</sup>	3.98 $\pm$ 0.41	2.90 $\pm$ 0.44	0.0909	3.63 $\pm$ 0.38	3.25 $\pm$ 0.35	0.3591
Gota Citoplasmática distal (%)	8.03 $\pm$ 0.80	6.39 $\pm$ 0.82	0.1541	6.91 $\pm$ 0.64	7.51 $\pm$ 0.62	0.2010
Gota citoplasmática proximal (%)	9.68 $\pm$ 0.88	9.85 $\pm$ 0.94	0.8923	10.23 $\pm$ 0.85	9.30 $\pm$ 0.78	0.3608

<sup>a</sup> La sesión se usó como covariable.

<sup>b</sup> El peso corporal al momento de la colección de semen se usó como covariable.

Medias con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Hubo una tendencia del orden de eyaculación sobre la presencia de gel ( $p \leq 0.1$ ), más presencia en la primera eyaculación) y la motilidad total ( $p \leq 0.1$ , mayor en la segunda). No hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en pH, motilidad progresiva, concentración espermática total ni en las anomalías.

**Cuadro 3.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculación sobre el tiempo de reacción, la concentración espermática total y la presencia de colas dobladas

Variable	Sin 6MBOA		Con 6MBOA		Valor <i>P</i>
	Primer Eyaculación	Segunda Eyaculación	Primer Eyaculación	Segunda Eyaculación	
N	92	90	88	90	
Tiempo de reacción (s) <sup>a</sup>	9.52 $\pm$ 1.65a	17.31 $\pm$ 1.68b	11.23 $\pm$ 1.69a	12.50 $\pm$ 1.68a	0.0226
Concentración espermática total ( $\times 10^6$ mL <sup>-1</sup> )	208.38 $\pm$ 45.31b	463.14 $\pm$ 46.45a	281.75 $\pm$ 50.51b	410.21 $\pm$ 45.93a	0.0315
Colas de espermatozoides dobladas (%) <sup>b</sup>	6.58 $\pm$ 0.71b	5.42 $\pm$ 0.73ab	4.00 $\pm$ 0.80a	4.89 $\pm$ 0.72ab	0.0255

<sup>a</sup> La sesión se usó como covariable.

<sup>b</sup> El peso corporal al momento de la colección de semen se usó como covariable.

Medias con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ )

La interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculación fue significativa ( $p \leq 0.05$ ) para el tiempo de reacción, la concentración espermática total y la presencia de colas dobladas (Cuadro 3). La segunda eyaculación del tratamiento testigo fue la única diferente presentando el tiempo de reacción más largo con respecto a las demás. Las segundas eyaculaciones presentaron las concentraciones espermáticas totales más altas y diferentes significativamente con respecto a las de la primera eyaculación de

ambos tratamientos. Al aplicar 6-MBOA se obtuvo la menor presencia de espermatozoides con colas dobladas siendo la primera eyaculación la de menor porcentaje mientras que el porcentaje mayor fue para la primera eyaculación sin 6-MBOA.

## 4.2 FASE 2: APLICACIÓN DE TRATAMIENTOS VÍA INTRAMUSCULAR

Se realizaron 358 colectas de semen, del total de colecciones realizadas para los dos tratamientos el número de evaluaciones fue de 331 (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Estadísticos descriptivos para peso de los conejos, libido y características seminales

Variable	N	Promedio	DE*	Mínimo	Máximo	CV**
Peso de machos a la colección (g)	360	3894.03	202.04	3365.0	4935.0	5.19
Tiempo de reacción (s)	360	19.37	27.45	0.00	217.63	141.76
Volumen (ml)	331	0.49	0.31	0.01	1.80	63.83
Presencia de Gel (%)	331	0.05	0.22	0.00	1.00	430.42
pH	331	7.22	0.44	6.00	9.00	6.05
Osmolaridad (mOsmol kg <sup>-1</sup> )	331	280.29	16.19	245.00	347.00	5.78
Motilidad total (%)	331	71.52	20.77	0.00	97.10	29.04
Motilidad progresiva (%)	331	38.77	19.70	0.00	83.10	50.82
Concentración espermática total (× 10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	331	370.89	309.47	4.48	1867.40	83.44
Concentración espermática por eyaculado (× 10 <sup>6</sup> )	331	158.20	150.71	0.79	1106.61	95.26
Viabilidad espermática (%)	331	89.87	8.82	39.50	99.30	9.81
Colas de espermatozoides dobladas (%)	331	6.08	4.97	0.00	37.80	81.61
Colas de espermatozoides enrolladas (%)	331	3.76	3.52	0.00	23.00	93.60
Gota citoplasmática distal (%)	331	9.00	5.78	1.40	36.00	64.25
Gota citoplasmática proximal (%)	331	6.90	4.86	0.00	34.00	70.51

\*DE = desviación estándar, \*\*CV = coeficiente de variación (%).

Se encontró un efecto de covariable lineal de orden de sesión para la osmolaridad ( $p \leq 0.0001$ ), la concentración espermática por mililitro y por eyaculado, y para la presencia de gota proximal ( $p \leq 0.05$ ). Se encontró efecto de las covariables lineales de sesión y peso corporal ( $p \leq 0.05$ ) para la presencia de espermatozoides con colas dobladas. Estas características espermáticas se ajustaron a una sesión de colección estándar de 5.6 y a un peso estándar de 3896 g (Cuadro 5).

Al igual que en la primera fase se no se encontraron diferencias significativas por el efecto del tratamiento ( $p > 0.05$ ), sin embargo, si se observan los resultados de forma global, de nuevo los valores de las variables analizadas se inclinan a favor del 6-MBOA.

En cuanto al orden de eyaculación se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.0001$ ) en tiempo de reacción (10.5 s más rápida la primera eyaculación), volumen (0.24 mL más en la primera eyaculación), osmolaridad (la primera eyaculación 2.5 % menos del promedio), motilidad progresiva (16.4 % mayor en la primera eyaculación) y concentración espermática por mililitro (70.9 % mayor para el segundo eyaculado).

Además se encontraron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) en el pH (0.12 más ácido en la primera eyaculación), en la viabilidad (1.8 % mayor el segundo eyaculado), en la presencia de colas enrolladas (30.7 % mayor en la segunda eyaculación) y en la presencia de gota citoplasmática distal (8.4 % más en el segundo eyaculado). Se presentó una tendencia ( $p \leq 0.1$ ) de mayor presencia de gel y menor presencia de espermatozoides con colas dobladas en la primera eyaculación. No presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en motilidad ni concentración por eyaculado.

**Cuadro 5.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto de 6-MBOA inyectado intramuscularmente y el orden de eyaculado en la libido y las características seminales en conejos Nueva Zelanda Blanco

Variable	Tratamiento			Eyaculado		
	Testigo	Con 6-MBOA	Valor <i>P</i>	Primero	Segundo	Valor <i>P</i>
N	172	159		162	169	
Tiempo de reacción (s)	23.11 $\pm$ 3.12	15.82 $\pm$ 3.10	0.1151	14.24 $\pm$ 2.57a	24.69 $\pm$ 2.61b	$\leq$ 0.0001
N	172	159		162	159	
Volumen (mL)	0.44 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.06	0.1581	0.62 $\pm$ 0.04a	0.38 $\pm$ 0.04b	$\leq$ 0.0001
pH	7.27 $\pm$ 0.06	7.17 $\pm$ 0.06	0.2321	7.28 $\pm$ 0.05a	7.16 $\pm$ 0.05b	0.0080
Presencia de Gel	0.05 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.7772	0.07 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	0.0746
Osmolaridad (mOsmol kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	280.41 $\pm$ 1.15	280.00 $\pm$ 1.20	0.8087	276.63 $\pm$ 1.19b	283.78 $\pm$ 1.16a	$\leq$ 0.0001
Motilidad (%)	67.95 $\pm$ 4.46	75.62 $\pm$ 4.48	0.2427	71.79 $\pm$ 3.30	71.78 $\pm$ 3.30	0.9976
Motilidad progresiva (%)	35.11 $\pm$ 5.01	44.10 $\pm$ 5.03	0.2237	42.62 $\pm$ 3.64a	36.60 $\pm$ 3.62b	$\leq$ 0.0001
Concentración espermática total ( $\times 10^6$ mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	374.44 $\pm$ 51.42	357.02 $\pm$ 51.92	0.8146	269.99 $\pm$ 39.53b	461.47 $\pm$ 39.08a	$\leq$ 0.0001
Concentración espermática por eyaculado ( $\times 10^6$ )	144.57 $\pm$ 20.01	172.83 $\pm$ 20.35	0.3366	158.50 $\pm$ 16.40	158.90 $\pm$ 16.11	0.9794
Viabilidad espermática (%)	88.06 $\pm$ 2.31	91.31 $\pm$ 2.40	0.3524	89.11 $\pm$ 1.75	90.26 $\pm$ 1.74	0.1712
Colas de espermatozoides dobladas (%) <sup>ab</sup>	6.83 $\pm$ 0.70	5.31 $\pm$ 0.71	0.1452	5.67 $\pm$ 0.56	6.48 $\pm$ 0.55	0.0997
Colas de espermatozoides enrolladas (%)	4.00 $\pm$ 0.62	3.37 $\pm$ 0.63	0.4922	3.19 $\pm$ 0.48a	4.17 $\pm$ 0.47b	0.0046
Gota Citoplasmática distal (%)	10.11 $\pm$ 1.10	7.89 $\pm$ 1.11	0.1747	8.24 $\pm$ 0.83a	9.76 $\pm$ 0.82b	0.0048
Gota Citoplasmática proximal (%) <sup>a</sup>	7.36 $\pm$ 0.83	6.40 $\pm$ 0.84	0.4233	7.02 $\pm$ 0.64	6.74 $\pm$ 0.63	0.5664

<sup>a</sup> La sesión se usó como covariable.

<sup>b</sup> El peso corporal al momento de la colección de semen se usó como covariable.

Medias con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Existe un efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) en la interacción de tratamiento y orden de eyaculación para el pH y la concentración espermática (Cuadro 6) en donde la segunda eyaculación con 6-MBOA presenta un pH más neutro y las segundas eyaculaciones presentan una concentración espermática mayor ( $43.14 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  más espermatozoides).

**Cuadro 6.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculación sobre el pH y la concentración espermática total por mililitro

Variable	Sin 6MBOA		Con 6MBOA		Valor P
	Primer Eyaculación	Segunda Eyaculación	Primer Eyaculación	Segunda Eyaculación	
N	85	87	77	82	
pH	$7.29 \pm 0.07b$	$7.26 \pm 0.07b$	$7.28 \pm 0.07b$	$7.05 \pm 0.07a$	0.0317
Concentración espermática total ( $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	$248.73 \pm 55.22b$	$500.15 \pm 55.05a$	$291.26 \pm 56.58b$	$422.79 \pm 55.50a$	0.0395

<sup>a</sup> La sesión se usó como covariable.

Medias con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.3 ANÁLISIS FASE 1 VS FASE 2 COMPLETO:

Se compararon las dos fases sin y con 6MBOA y vías de aplicación (subcutánea e intramuscular), se realizaron 720 colectas de semen, del total de colecciones realizadas para los dos tratamientos el número de evaluaciones fue de 649 (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Estadísticos descriptivos para peso de los conejos, libido y características seminales

Variable	N	Promedio	DE*	Mínimo	Máximo	CV**
Peso de machos a la colección (g)	720	3830.57	226.04	3310.0	4935.0	5.90
Tiempo de reacción (s)	720	16.00	22.09	0.00	217.63	138.09
Volumen (mL)	649	0.47	0.29	0.01	1.80	62.76
Presencia de gel	649	0.05	0.22	0.00	1.00	425.63
pH	649	7.25	0.45	6.00	9.00	6.27
Osmolaridad (mOsmol kg <sup>-1</sup> )	649	294.34	20.39	244.00	347.00	6.93
Motilidad total (%)	649	71.18	20.14	0.00	97.10	28.30
Motilidad progresiva (%)	649	38.14	19.44	0.00	84.70	50.96
Concentración espermática total (× 10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	649	359.10	300.85	3.84	1867.40	83.78
Concentración espermática por eyaculación (×10 <sup>6</sup> )	649	151.34	149.25	0.77	1106.61	98.62
Viabilidad espermática (%)	649	89.82	9.01	27.30	100.00	10.03
Colas de espermatozoides dobladas (%)	649	5.71	4.79	0.00	37.80	83.89
Colas de espermatozoides enrolladas (%)	649	3.63	3.68	0.00	36.40	101.55
Gota citoplasmática distal (%)	649	8.14	5.35	0.00	36.00	65.67
Gota citoplasmática proximal (%)	649	8.29	7.27	0.00	64.60	87.68

\*DE = desviación estándar, \*\*CV = coeficiente de variación (%).

Se encontró un efecto de covariable lineal de orden de sesión para el tiempo de reacción, la osmolaridad ( $p \leq 0.0001$ ) y el pH ( $p \leq 0.05$ ). Un efecto de covariable lineal de peso corporal para la presencia de espermatozoides con colas dobladas ( $p \leq 0.0001$ ) y colas enrolladas ( $p \leq 0.05$ ). También se observó efecto de las covariables lineales de sesión y peso corporal ( $p \leq 0.05$ ) para la motilidad total, la motilidad progresiva, la presencia de gota citoplasmática distal y para la presencia de gota proximal. Estas características espermáticas se ajustaron a una sesión de colección estándar de 10.7 y a un peso estándar de 3834 g (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto del 6-MBOA y el orden de eyaculación en la libido y las características seminales en conejos Nueva Zelanda Blanco

Variable	Tratamiento			Eyaculación		
	Testigo	Con 6-MBOA	Valor <i>P</i>	Primera	Segunda	Valor- <i>P</i>
N	361	359		365	355	
Tiempo de reacción (s) <sup>a</sup>	18.35 $\pm$ 2.02	13.70 $\pm$ 2.02	0.1187	12.23 $\pm$ 1.63a	19.82 $\pm$ 1.64b	$\leq$ 0.0001
N	343	306		309	340	
Volumen (mL)	0.41 $\pm$ 0.05b	0.55 $\pm$ 0.05a	0.0600	0.59 $\pm$ 0.04a	0.36 $\pm$ 0.04b	$\leq$ 0.0001
Presencia de Gel (%)	0.05 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.7089	0.07 $\pm$ 0.02a	0.03 $\pm$ 0.02b	0.0202
pH <sup>a</sup>	7.27 $\pm$ 0.05	7.24 $\pm$ 0.05	0.6086	7.30 $\pm$ 0.04b	7.21 $\pm$ 0.04a	0.0086
Osmolaridad (mOsmol kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	294.34 $\pm$ 0.87	294.04 $\pm$ 0.93	0.8129	291.50 $\pm$ 0.87a	296.89 $\pm$ 0.87b	$\leq$ 0.0001
Motilidad (%) <sup>ab</sup>	68.66 $\pm$ 3.32	74.01 $\pm$ 3.35	0.2573	70.45 $\pm$ 2.53	72.21 $\pm$ 2.50	0.1914
Motilidad progresiva (%) <sup>ab</sup>	36.88 $\pm$ 4.23	40.78 $\pm$ 4.26	0.4862	40.69 $\pm$ 3.27a	36.98 $\pm$ 3.25b	0.0007
Concentración espermática total ( $\times 10^6$ mL <sup>-1</sup> )	350.00 $\pm$ 44.04	355.71 $\pm$ 44.63	0.9269	255.56 $\pm$ 33.83b	450.15 $\pm$ 33.32a	$\leq$ 0.0001
Concentración espermática por eyaculación ( $\times 10^6$ )	140.00 $\pm$ 15.92	162.98 $\pm$ 16.32	0.3239	148.63 $\pm$ 13.01	154.35 $\pm$ 12.62	0.6168
Viabilidad espermática (%)	89.47 $\pm$ 1.99	90.08 $\pm$ 2.00	0.8174	88.62 $\pm$ 1.53b	90.92 $\pm$ 1.52a	$\leq$ 0.0001
Colas de espermatozoides dobladas (%) <sup>b</sup>	6.40 $\pm$ 0.64	4.92 $\pm$ 0.65	0.1164	5.51 $\pm$ 0.50	5.81 $\pm$ 0.49	0.3702
Colas de espermatozoides enrolladas (%) <sup>b</sup>	3.99 $\pm$ 0.46	3.13 $\pm$ 0.47	0.2059	3.41 $\pm$ 0.36	3.71 $\pm$ 0.36	0.2818
Gota Citoplasmática distal (%) <sup>ab</sup>	8.98 $\pm$ 0.82	7.26 $\pm$ 0.83	0.1477	7.62 $\pm$ 0.63a	8.63 $\pm$ 0.62b	0.0055
Gota citoplasmática proximal (%) <sup>ab</sup>	8.51 $\pm$ 0.83	8.06 $\pm$ 0.85	0.7051	8.57 $\pm$ 0.67	7.99 $\pm$ 0.65	0.3012

<sup>a</sup> La sesión se usó como covariable.

<sup>b</sup> El peso corporal al momento de la colección de semen se usó como covariable.

Medias con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ )



Se compararon las dos fases sin y con 6MBOA y formas de aplicación (subcutánea e intramuscular), para determinar si hubo diferencias significativas: entre tratamientos hubo una tendencia en cuanto a volumen ( $p \leq 0.05$ ), donde en los conejos a los que se les aplicó 6MBOA se obtuvieron 0.14 mL más de semen que en el grupo testigo, los valores de las variables analizadas se inclinaron a favor de los tratamientos con 6-MBOA.

Como ya se ha demostrado en los resultados anteriores, hubo diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.0001$ ) entre el orden de eyaculación sobre el tiempo de reacción (7.6 s más rápida la primera eyaculación), el volumen (0.23 mL más la primera eyaculación), la osmolaridad (1.8 % menor en el primer eyaculado), la concentración espermática por mililitro (76.1 % más la segunda eyaculación) y la viabilidad (2.6 % mayor en la segunda eyaculación). Además se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en presencia de gel (133.3 % más presencia en la primera eyaculación), pH (0.09 más neutro la segunda eyaculación), motilidad progresiva (10.0 % mayor en la segunda eyaculación) y gota citoplasmática distal (13.3 % más en la segunda eyaculación).

La interacción entre tratamiento y el orden de eyaculación fue significativa ( $p \leq 0.05$ ), el tiempo de reacción más tardado fue para la segunda eyaculación sin 6-MBOA, la concentración espermática por mililitro más alta fue para la segunda eyaculación con y sin 6-MBOA, la concentración espermática por eyaculación más alta fue para la primera eyaculación con 6-MBOA y la más baja la primera eyaculación sin 6-MBOA, en relación a presencia de espermatozoides con las colas dobladas, la menor fue para la primera eyaculación con 6-MBOA y la mayor para la primera eyaculación sin 6-MBOA (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto de la interacción entre el tratamiento y el orden de eyaculación sobre el tiempo de reacción, la concentración espermática total (mL y eyaculación) y la presencia de colas dobladas

Variable	Sin 6MBOA		Con 6MBOA		Valor <i>P</i>
	Primer Eyaculación	Segunda Eyaculación	Primer Eyaculación	Segunda Eyaculación	
N	181	180	184	175	
Tiempo de reacción (s) <sup>a</sup>	12.80 $\pm$ 2.28a	23.90 $\pm$ 2.30b	11.65 $\pm$ 2.28a	15.75 $\pm$ 2.31a	0.0235
Concentración espermática total ( $\times 10^6$ mL <sup>-1</sup> )	221.68 $\pm$ 45.94b	478.32 $\pm$ 46.42a	289.43 $\pm$ 47.85b	421.98 $\pm$ 46.42a	0.0027
Concentración espermática por eyaculación ( $\times 10^6$ )	123.47 $\pm$ 17.61b	156.53 $\pm$ 17.95a	173.79 $\pm$ 18.90a	152.17 $\pm$ 17.79ab	0.0170
Colas de espermatozoides dobladas (%) <sup>b</sup>	6.62 $\pm$ 0.68b	6.19 $\pm$ 0.68ab	4.41 $\pm$ 0.71a	5.44 $\pm$ 0.68b	0.0308

<sup>a</sup> La sesión se usó como covariable.

<sup>b</sup> El peso corporal al momento de la colección de semen se usó como covariable.

Medias con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.4 COMPARACIÓN DE LA VÍA DE APLICACIÓN DE 6-MBOA (SUBCUTÁNEA vs INTRAMUSCULAR)

Se compararon las vías de aplicación de 6-MBOA, para determinar con cuál se obtienen mejores resultados, en total se analizaron 359 colectas de semen; del total de colecciones realizadas para los dos tratamientos el número de evaluaciones fue de 306 (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Estadísticos descriptivos para peso de los conejos, libido y características seminales

<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>Promedio</b>	<b>DE*</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>CV**</b>
Peso de machos a la colección (g)	359	3823.70	222.85	3310.00	4290.00	5.83
Tiempo de reacción (s)	359	13.76	14.74	1.60	134.47	107.12
Presencia de gel	306	0.06	0.24	0.00	1.00	389.29
Volumen (mL)	306	0.50	0.31	0.05	1.80	63.07
pH	306	7.23	0.45	6.00	9.00	6.26
Osmolaridad (mOsmol kg <sup>-1</sup> )	306	294.14	20.69	244.00	341.00	7.03
Motilidad total (%)	306	75.00	16.03	0.00	96.50	21.37
Motilidad progresiva (%)	306	41.56	17.99	0.00	84.70	43.28
Concentración espermática total (× 10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	306	361.28	274.47	15.37	1556.17	75.97
Concentración espermática por eyaculación (×10 <sup>6</sup> )	306	160.06	150.51	6.40	1106.61	94.03
Viabilidad espermática (%)	306	91.31	6.63	48.50	100.00	7.26
Colas de espermatozoides dobladas (%)	306	4.87	3.39	0.20	28.00	69.64
Colas de espermatozoides enrolladas (%)	306	3.21	2.92	0.00	17.70	91.01
Gota citoplasmática distal (%)	306	7.07	4.60	0.00	36.0	65.09
Gota citoplasmática proximal (%)	306	8.03	6.08	0.00	39.10	75.72

\*DE = desviación estándar, \*\*CV = coeficiente de variación (%).

Se encontró un efecto de covariable lineal de orden de sesión ( $p \leq 0.05$ ) para el tiempo de reacción y hubo efecto de las covariables lineales de sesión y peso corporal para la osmolaridad ( $p = \leq 0.0001$ ) se ajustó a una sesión de colección estándar de 10.6 y a un peso corporal de 3826 g (Cuadro 11).

Al comparar las dos aplicaciones se encontraron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.0001$ ) al aplicarlo vía intramuscular en la osmolaridad (10 % más alta que al inyectarla subcutáneamente) y en la presencia de la gota citoplasmática proximal (53.9 % más al inyectarla subcutáneamente).

**Cuadro 11.** Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  error estándar) para el efecto del 6-MBOA inyectado intramuscularmente y el orden de eyaculado en la libido y las características seminales en conejos Nueva Zelanda Blanco

Variable	Tratamiento 6-MBOA			Eyaculado		
	Inyectado subcutáneo	Inyectado intramuscular	Valor <i>P</i>	Primero	Segundo	Valor <i>P</i>
N	178	181		184	175	
Tiempo de reacción (s) <sup>a</sup>	14.94 $\pm$ 2.22	12.63 $\pm$ 2.18	0.4279	11.80 $\pm$ 1.80a	15.77 $\pm$ 1.81b	0.0066
N	147	159		136	170	
Presencia de Gel	0.08 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.02	0.5174	0.09 $\pm$ 0.03a	0.03 $\pm$ 0.02b	0.0430
Volumen (mL)	0.47 $\pm$ 0.06b	0.56 $\pm$ 0.06a	0.0026	0.63 $\pm$ 0.06a	0.40 $\pm$ 0.06b	$\leq$ 0.0001
pH	7.30 $\pm$ 0.06b	7.17 $\pm$ 0.06a	0.0048	7.30 $\pm$ 0.06b	7.17 $\pm$ 0.05a	0.0109
Osmolaridad (mOsmol kg <sup>-1</sup> )	308.43 $\pm$ 4.75b	280.51 $\pm$ 4.70a	$\leq$ 0.0001	291.96 $\pm$ 4.53a	296.98 $\pm$ 4.48b	0.0025
Motilidad (%)	74.74 $\pm$ 2.73	75.54 $\pm$ 2.70	0.6306	75.03 $\pm$ 2.77	75.26 $\pm$ 2.68	0.8922
Motilidad progresiva (%)	41.55 $\pm$ 4.71	43.94 $\pm$ 4.70	0.1053	44.63 $\pm$ 4.72a	40.85 $\pm$ 4.68b	0.0131
Concentración espermática total ( $\times 10^6$ mL <sup>-1</sup> )	342.90 $\pm$ 49.28	357.48 $\pm$ 48.82	0.5944	217.27 $\pm$ 48.49b	417.27 $\pm$ 48.49a	$\leq$ 0.0001
Concentración espermática por eyaculación ( $\times 10^6$ )	145.95 $\pm$ 17.92	172.18 $\pm$ 17.43	0.1200	168.41 $\pm$ 18.39	149.71 $\pm$ 17.10	0.2770
Viabilidad espermática (%)	91.21 $\pm$ 1.15	91.24 $\pm$ 1.14	0.9626	90.39 $\pm$ 1.16b	92.06 $\pm$ 1.13a	0.0170
Colas de espermatozoides dobladas (%)	4.33 $\pm$ 0.51a	5.26 $\pm$ 0.50b	0.0097	4.29 $\pm$ 0.51a	5.30 $\pm$ 0.49b	0.0064
Colas de espermatozoides enrolladas (%) <sup>b</sup>	2.78 $\pm$ 0.52a	3.39 $\pm$ 0.51b	0.0418	2.75 $\pm$ 0.52a	3.42 $\pm$ 0.51b	0.0278
Gota Citoplasmática distal (%)	6.17 $\pm$ 0.64a	7.89 $\pm$ 0.63b	0.0006	6.56 $\pm$ 0.65	7.50 $\pm$ 0.62	0.0629
Gota Citoplasmática proximal (%)	9.85 $\pm$ 0.54b	6.40 $\pm$ 0.52a	$\leq$ 0.0001	8.35 $\pm$ 0.56	7.90 $\pm$ 0.50	0.5094

<sup>a</sup> La sesión se usó como covariable.

Medias con distinta literal son diferentes ( $p \leq 0.05$ )

También se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) con mayor volumen (0.09 mL más) y menor pH (0.13 menos) al inyectarlo intramuscularmente, y menor presencia de colas dobladas (21.5 % menos), presencia de colas enrolladas (21.9 % menos) y presencia de gota citoplasmática distal (27.9 % menos) al inyectarlo subcutáneamente.

Con respecto al orden de eyaculación se encontró, al igual que en los análisis anteriores, diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.0001$ ) para el volumen (23 mL más la primera eyaculación) y concentración espermática por mililitro (92.1 % más en el segundo eyaculado). También se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para la presencia de gel (200 % más veces en la primera eyaculación), el pH (0.13 menos en la segunda eyaculación), la osmolaridad (1.7 % menor en la primera eyaculación), la motilidad progresiva (9.3 % mayor en el primer eyaculado), la viabilidad (1.8 % mayor en la segunda eyaculación), los espermatozoides con colas dobladas (23.5 % más en la segunda eyaculación) y los espermatozoides con colas enrolladas (24.4 % más en la primera eyaculación). Además se presentó una tendencia ( $p \leq 0.1$ ) a mayor presencia de gota citoplasmática distal en la segunda eyaculación (43.4 % más).

## 5 DISCUSIÓN

Gran parte del éxito de la fertilidad y la prolificidad en IA radica en tener parámetros seminales adecuados ya que un sólo macho puede afectar la respuesta de hasta 100 hembras (Alvariño, 2000; Paál *et al.*, 2014); pero para lograrlo se debe tomar en cuenta que múltiples factores externos como la estación, la luz, el manejo, la alimentación, etc., y factores internos como la genética, la edad y la salud entre otros, pueden afectar el comportamiento reproductivo de los machos y la producción de semen, (Alvariño, 2000; Castellini, 2008; Theau-Clément *et al.*, 2015).

El 6-MBOA ha mostrado tener buenos resultados en reproducción en pequeños herbívoros (Berger *et al.*, 1981; Sanders *et al.*, 1981; Cranford, 1983; Schadler *et al.*, 1988; Boyd y Bray, 1989); sin embargo, en este experimento no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (6-MBOA vs testigo) al igual que otras investigaciones anteriores (Anderson *et al.*, 1988; Urbanski *et al.*, 1990), tal vez porque tiene un efecto más marcado en animales silvestres que en animales en condiciones controladas (Yuwiler y Winters, 1985; Boyd y Bray, 1989). No obstante, se observaron dos tendencias: cuando se aplicó el 6-MBOA vía subcutánea fue menor la presencia de espermatozoides con colas enrolladas; y al comparar la fase uno con la fase dos se observó un mayor volumen con 6-MBOA. Cabe destacar que los resultados de las variables analizadas están dentro de los parámetros normales y aunque no se presentaron diferencias siempre favorecieron al grupo que se le inyectó 6-MBOA, independientemente del tipo de aplicación, subcutánea o intramuscular: el tiempo de reacción así como las anomalías tendieron a ser menores, la presencia de gel, el volumen, la motilidad total y progresiva, la concentración espermática por eyaculado y

por mililitro, y la viabilidad tendieron a ser mayores, que en el testigo. Principalmente a nivel de la morfología, tendió a presentar un porcentaje menor de espermatozoides con colas dobladas la cual es una anomalía muy común (Dott, 1969; Kuzminsky *et al.*, 1996).

Los problemas de viabilidad y las anomalías del semen están asociadas a la pérdida de fertilidad y a la eficiencia reproductiva (Porcelli *et al.*, 1984), la disminución en las anomalías ya se había presentado anteriormente al suplementar con germinados de trigo como fuente de 6-MBOA a machos Nueva Zelanda Blanco (Fallas-López *et al.*, 2011). Las variaciones morfológicas de los espermatozoides están relacionadas con las secreciones de las glándulas sexuales (León *et al.*, 1991) y la viabilidad con los andrógenos presentes mientras los espermatozoides están madurando en el epidídimo (Alvaríño, 2000). Se ha reportado que en el lumen del conducto existe un mecanismo para eliminar los defectos morfológicos como una autólisis (Pérez-Sánchez *et al.*, 1997). Si el 6-MBOA actúa a nivel neuroendócrino (Sanders *et al.*, 1981), ya sea como agonista o antagonista de la melatonina (Grobner *et al.*, 1987; Yuwiler y Winters, 1985; Boyd y Bray, 1989; Daya *et al.*, 1990), y favorece la liberación de FSH (Butterstein *et al.*, 1985; Schadler *et al.*, 1988) esto puede estar relacionado con una mayor producción de andrógenos lo que beneficia la maduración de los espermatozoides. Así que, no sólo la motilidad es de gran importancia para la tasa de fertilidad, también la viabilidad espermática y la morfología juegan un papel muy importante (Quintero-Moreno *et al.*, 2007).

Los experimentos se realizaron en verano y aunque los conejos se mantuvieron en condiciones controladas, se ha demostrado que el estrés calórico disminuye la

viabilidad de los espermatozoides y aumentan el porcentaje de anomalías pero sin afectar la fertilidad ni la prolificidad (Sabés *et al.*, 2015).

Muchos otros autores han aplicado el 6-MBOA en implantes (Vaughan *et al.*, 1988; Boyd y Bray, 1989; Nelson y Shiber, 1990; Urbanski *et al.*, 1990) o en inyecciones intraperitoneales (Sanders *et al.*, 1981; Cranford, 1983), sin embargo, en este trabajo la dosis que se utilizó ( $0.167 \text{ mg kg}^{-1}$  de 6-MBOA) como la forma de aplicarla se basó en el experimento que realizaron Grobner *et al.* (1987) en conejas nulíparas; ellos extrapolaron las dosis que se dieron en otras especies a conejos y la dosis elegida fue la que demostró los resultados más favorables. La mayoría de estos autores atribuyen los resultados de sus experimentos a la similitud del 6-MBOA con la melatonina y al efecto del fotoperíodo pero si tiene su sitio de acción en la glándula pineal y puede estimular o inhibir la biosíntesis de melatonina, se asume que tiene una acción más compleja ya que la melatonina está relacionada con múltiples funciones a nivel corporal (Yuwiler y Winters, 1985; Boyd y Bray, 1989).

La media del tiempo de reacción (13.7 s) fue más alta que cuando se suplementó con germinados de trigo (8.6 s) (Fallas-López *et al.*, 2011), muy similar (13.2 s) a la que presentó Rodríguez-De Lara *et al.* (2010) y mucho más corta que las reportadas por Brun *et al.* (2004) y Gado *et al.* (2015) (27.9 s y  $>22.3$  s, respectivamente), esto puede deberse a la diferencia en las edades de los machos.

Al analizar la interacción entre tratamiento y el orden de eyaculación se observa que con el 6-MBOA disminuyó la diferencia del tiempo de reacción entre eyaculaciones, lo cual significa que la libido no disminuyó para la segunda eyaculación, como se observó en el grupo testigo. Gado *et al.* (2015) encontraron que niveles de testosterona



ligeramente más altos en sangre aparentemente mejoran el tiempo de reacción, y confirmaron que la disminución en la concentración de testosterona se relacionó con bajo deseo sexual.

Además, en las interacciones la concentración espermática por mililitro fue mayor en la segunda eyaculación. Varios autores no encontraron efecto significativo sobre los niveles de LH y FSH en machos hámster (Urbanski *et al*, 1990) ni en conejos (Boyd y Bray, 1989), lo que sugiere que el 6-MBOA no baja los niveles de hormonas ni tiene un efecto negativo.

Tanto el volumen como la motilidad de la primera y segunda eyaculación se encuentran dentro de los rangos que presentó Alvariño (2000) en una tabla comparativa de varios autores. Theau-Clément *et al.* (2015) encontraron un volumen promedio en época de verano (0.43 mL) similar al observado en el presente experimento (0.4 mL), así como un volumen mayor para la primer eyaculación con respecto a la segunda (0.53 y 0.42 mL, respectivamente), como muestra también Alvariño (2000) en su tabla de rangos; pero otros autores encontraron un volumen mucho más alto: alrededor de 0.95 mL (Dubiel *et al.*, 1985; Quintero-Moreno *et al.*, 2007).

La presión osmótica del semen es de gran importancia para mantener la motilidad, viabilidad e integridad del espermatozoide; Fraser *et al.* (2001) demostraron que para que no se vea afectada ni la movilidad ni la viabilidad espermática se requiere que la osmolaridad se mantenga en un rango de 250 a 290 mOsmol kg<sup>-1</sup>, pero para la conservación del semen se pueden manejar hasta 380 mOsmol kg<sup>-1</sup> (Gadea, 2003). En este trabajo se encontró que la osmolaridad siempre se mantuvo dentro de los rangos normales (244 a 347 mOsmol kg<sup>-1</sup>): los más altos se presentaron en la primera fase

cuando se aplicó 6-MBOA y el placebo por vía subcutánea, y el que se mantuvo en un promedio ideal fue al aplicarlo vía intramuscular.

Los porcentajes de motilidad fueron similares a los obtenidos por Quintero-Moreno *et al.* (2007), Dubiel *et al.* (1985) y Theau-Clément *et al.* (2015), inclusive más altos que los que encontraron estos últimos autores en verano, misma época en que se realizó el experimento, pero son mucho menores a los reportados por Lavara *et al.* (2005) (80.5%). La motilidad progresiva por orden de eyaculación fue ligeramente más baja que la reportada por Theau-Clément *et al.* (2015) y Paál *et al.* (2014), y un poco mayor a la que obtuvieron en verano.

La concentración espermática total para los tratamientos como para las dos eyaculaciones fue más baja con respecto a lo reportado por varios autores (Paál *et al.*, 2014; Theau-Clément *et al.*, 2015) pero muy similar a los encontrados en otros estudios (Alvariño, 2000; Castellini *et al.*, 2006; Quintero-Moreno *et al.*, 2007; Rodríguez-De Lara *et al.*, 2010; Fallas-López *et al.*, 2011). En este caso puede haber afectado la edad de los machos (más de 2 años) y la estación del año como lo comprobaron Theau-Clément *et al.* (2015), así como el hecho de que los estudios recientes, realizados en Europa, cuentan con animales genéticamente mejorados.

Al comparar los dos tipos de aplicaciones de 6-MBOA (subcutánea vs intramuscular) con la vía intramuscular se observó que fue más alto el volumen, la motilidad progresiva y fue más bajo el pH y la presencia de gota citoplasmática proximal, mientras que cuando se aplicó vía subcutánea, se disminuyó el tiempo de reacción y la presencia de colas dobladas y enrolladas y de gota citoplasmática distal. Con los dos tipos de aplicaciones se obtuvieron resultados favorables que se encuentran dentro de

la normalidad demostrada en experimentos previos (Fallas-López *et al.*, 2011). Tanto la inyección subcutánea como la intramuscular consisten en administrar la sustancia por vía parental para que de forma fisiológica se absorba por medio de capilares sanguíneos; por la vía subcutánea la velocidad de absorción es más lenta con respecto a la intramuscular por la escasa vascularización del tejido adiposo (Vílchez y Luengo, 1994), esto nos indica una absorción más rápida favorece principalmente el volumen y movilidad del semen, mientras que con una absorción más lenta se mejora la libido y las características de morfología.

Para elegir cual vía de aplicación usar en una granja es necesario hacer un análisis previo de la calidad del semen de los machos para determinar si hay una mayor presencia de anomalías, sobre todo si éstas se observan en colas, se puede aplicar vía subcutánea al igual que si se quiere aumentar la libido. Pero si lo que se quiere es obtener más dosis con motilidades altas se puede aplicar vía intramuscular.

## 6 CONCLUSIONES

El primer eyaculado presenta un menor tiempo de reacción, un mayor volumen, una osmolaridad más adecuada, una mayor motilidad progresiva y menores anomalías, mientras que el segundo eyaculado presenta una mayor concentración por mililitro y una mayor viabilidad, por lo que se recomienda continuar utilizando dos eyaculados por día de trabajo.

La aplicación de extracto de 6-MBOA inyectado por vía subcutánea y por vía intramuscular durante tres días consecutivos bajo un ritmo semi-intensivo de reproducción no mostró diferencias en el tiempo de reacción ni en las características espermáticas. Pero en las interacciones entre el tratamiento y el orden de eyaculado el 6-MBOA disminuyó la presencia de colas dobladas en los espermatozoides y al aplicarlo vía subcutánea aumentó la libido en la segunda eyaculación.

## 7 LITERATURA CITADA

- Alvariño, J.M.R., 2000. Reproductive performance of male rabbits. In: 7<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Valencia, Spain. Pp.13-35.
- Amann, R.P., J.T. Lambiase, 1967. The male rabbit. I. Changes in semen characteristics and sperm output between puberty and one year of age. *J. Reprod. Fertil.* 14, 329–332.
- Anderson, K.D., R.J. Nachman, T.W. Turek, 1988. Effects of melatonin and 6-methoxybenzoxazolinone on photoperiodic control of testis size in adult male golden hamsters. *J. Pineal Res.* 5: 351-365.
- Battaglini, M., C. Castellini, P. Lattaioli, 1992. Variability of the main characteristics of rabbit semen. *J. Appl. Rabbit Res.* 15, 439–446.
- Berger, P.J., N.C. Negus, E.H. Sanders, P.D. Gardner. 1981. Chemical triggering of reproduction in *Microtus montanus*. *Science* 214: 69-70.
- Boiti, C., 2004. Underlying physiological mechanisms controlling the reproductive axis of rabbit does, in: Proc.: 8th World Rabbit Congress. Becerril, CM, Puebla, A. Pro. (Eds), WRSA, Mexico. pp. 186–206.
- Boyd, I.L., C.J. Bray. 1989. Nutritional ecology of wild rabbit – an input to timing of reproduction, in: Proc. of the Nutrition Society. 48, 81-91.
- Brun, J.M., M. Theau-Clément, J. Esparbié, J. Falières, G. Saleil, C. Larzul. 2006. Semen production in two rabbit lines divergently selected for 63-d body weight. *Theriogenology*. 66: 2165-2172. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.07.004

- Brun, J.M., M. Theau-Clément, C. Larzul, J. Falières, G. Saleil. 2004. Semen production in two rabbit lines divergently selected for 63-d body weight, In: Proceeding of Eighth World Rabbit Congress, Puebla, México, September 7-10, pp. 238-244.
- Butterstein, G.M., M.H. Schadler. 1988. The plant metabolite 6-methoxybenzoxazolinone interacts with follicle-stimulating hormone to enhance ovarian growth. *Biol. Reprod.* 39: 465-471.
- Butterstein, G.M., M.H. Schadler, E. Lysogorski, L. Robin, S. Sipperly. 1985. A Naturally occurring plant compound, 6-methoxybenzoxazolinone stimulates reproductive responses in rats. *Biol. Reprod.* 32: 1018-1023.
- Castellini, C., 2008. Semen production and management of rabbits bucks. 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress, June 10-13. Verona, Italy. 267-278.
- Castellini, C., P. Lattaioli, R. Cardinali, A. Dal Bosco. 2006. Effect of collection rhythm on spermatozoa and droplet concentration of rabbit semen. *World Rabbit Science.* 14, 101-106.
- Cranford, J.A., 1983. Effect of 6-MBOA on *Microtus pinetorum* and *Microtus pennsylvanicus* of different ages. Eastern Pine and Meadow Vole Symposia. University of Nebraska – Lincoln. pp. 111-116.
- Daya, S., B. Pangerl, M.E. Troiani, R.J. Reiter. 1990. Effect of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the activity of rat pineal n-acetyltransferase and hydroxyindole-0-methyltransferase and on melatonin production. *J. Pineal Res.* 8: 57-66.
- Dimitrova, I., G. Angelov, A. Teneva, P. Uzev. 2009. Artificial insemination of rabbits. *Biotechnology in Animal Husbandry.* 25, 1249-1253.

- Dott, H.M., 1969. Preliminary examination of bull, ram and rabbit spermatozoa with the stereoscan electron microscope. *J. Reprod. Fertil.* 18, 133-134
- Dubiel, A., J. Krolinski, C. Karpiak. 1985. Semen quality in different breeds of rabbits in different seasons. *Med. Weterynaryja*, 41 (11), 680-684.
- Epstein, W.W., C.N. Rowsemitt, P.J. Berger, N.C. Negus. 1986. Dynamics of 6-methoxybenzoxazolinone in winter wheat. *J. Chem. Ecol.* 12, 2011–2020.
- Fallas-López, M., R. Rodríguez-De Lara, R. Bárcena-Gama, M.T Sánchez-Torres Esqueda, D. Hernández-Sánchez, P.A. Martínez-Hernández, O. Aguilar-Romero. 2011. Rabbit sexual behavior, semen and sperm characteristics when supplemented with sprouted wheat. *Anim. Reprod. Sci.* 129, 221–228.
- Fraser, L., Gorszczaruk, K., Strezezek, J. 2001. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. *Reprod. Domest. Anim.*, 36: 325-329.
- Gadea, J. 2003. Semen extenders used in artificial insemination of swine. A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1: (2) 17-27.
- Gado, H., M. Mellado, A.Z.M. Salem, A. Zaragoza, T.S.T. Seleem. 2015. Semen characteristics, sexual hormones and libido of Hy-plus rabbit bucks influenced by dietary multi-enzyme additive. *World Rabbit Sci.* 23, 111-120.  
Doi:10.4995/wrs.2015.3464
- Gogol, P., M. Bochenek, Z. Smorağ. 2002. Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. *Reprod. Dom. Anim.* 37, 92-95.

- Grobner, M.A., P.R. Cheeke, N.M. Patton, R.J. Nachman. 1987. The effect of 6-methoxybenzoxazolinone (6-MBOA) on ovarian and uterine weights in non-parous rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.* 3, 222-226.
- Korn, H., M.J. Taitt. 1987. Initiation of early breeding in a population of *Microtus townsendii* (rodentia) with the secondary plant compound 6-MBOA. *Oecology.* 71: 593-596.
- Kuzminsky, G., A.M. Fusto, P. Morera. 1996. Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 565-575.
- Lavara, G. R., 2009. Estimación de los parámetros genéticos de producción y calidad seminal en una línea paternal de conejos. Tesis Master. Universidad Politécnica de Valencia. pp. 58.
- Lavara, R., E. Mocé, F. Lavara, M.P. Viudes de Castro, J.S. Vicente. 2005. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology.* 66, 1130-1141.  
doi:10.1016/j.theriogenology.2005.01.009
- León, H., A.A. Porras, C.S. Galina, R. Navarro-Fierro. 1991. Effect of collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics. *Theriogenology* 36, 349–355.
- Luzi, F., L. Maertens, P. Mijten, F., Pizzi. 1996. Effect of feeding level and dietary protein content on libido and semen characteristics of bucks. In: Lebas F (ed), Proc Sixth World Rabbit Congress, Toulouse, Association Francaise de Cuniculture, Lempdes, France, 2: 87–92



- Menchetti, L., G. Brecchia, R. Cardinali, A. Polisca, C. Boiti. 2015. Food restriction during pregnancy: effects on body condition and productive performance of primiparous rabbit does. *World Rabbit Sci.* 23, 1. doi:10.4995/wrs.2015.1703
- Minelli, G., P. Zucchi, F. Luzi, C. Cavani. 1999. Effect of high dietary vitamins C and E administered alone or mixed: influence on rabbit semen characteristics. *World Rabbit Sci.* 7, 31.
- Mocé, E., R. Lavara, F. Lavara, J.S. Vicente. 2000. Effect of reproductive rhythm of seminal parameters from a rabbit line with high growth rate. Proc. 7<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Valencia, Spain. A: 197-201.
- Negus, N.C., P.J. Berger. 1977. Experimental triggering of reproduction in a natural population of *Microtus montanus*. *Science* 196: 1230-1231.
- Nelson, R. J., J.M.C. Biota. 1993. 6-Methoxy-benzoxazolinone and photoperiod: prenatal and postnatal influences on reproductive development in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Can. J. Zool.* 71: 776-789.
- Nelson, R.J., J.R. Shiber. 1990. Photoperiod affects reproductive responsiveness to 6-Methoxy-2-Benzoxazolinone in house mice. *Biology of Reproduction.* 43, 586-591.
- Ogawa, S., I.S. Parhar. 2014. Structural and functional divergence of gonadotropin-inhibitory hormone from jawless fish to mammals. *Front. Endocrinol.*, 5, 177. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.00177>
- Paál, D., J. Kročková, L. Ondruška, T. Slanina, F. Strejček, P. Massányi. 2014. Effect of semen collection frequency on the progress in the motility of rabbit spermatozoa. *Slovak J. Anim. Sci.* 2, 61-67.

- Pérez-Sánchez, F., L. Tablado, C. Soler. 1997. Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. *Theriogenology*. 47 (4), 893-901.
- Pérez-Sánchez, F., L. Tablado, C.H. Yeung, T. G. Cooper, C. Soler. 1996. Changes in the motility patterns of spermatozoa from the rabbit epididymis as assessed by computer-aided sperm motion analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 364-371.
- Pinter, A.J., M. Negus. 1965. Effects of nutrition and photoperiod on reproduction physiology of *Microtus montanus*. *Am. J. Physiol.* 208: 633-638.
- Poole, W.E., 1960. Breeding of the wild rabbit in relation to environment. *CSIRO Wild Res.* 5, 21-43.
- Porcelli, F., C.A. Redi, G. Succi. 1984. Chromatin condensation patterns of spermatozoa during epididymal passage in normal and a chimeric bull. *Basic Appl. Histochem.* 28, 159–168.
- Rodríguez-De Lara, R., M. Fallas-López, R. Rangel-Santos, V. Mariscal-Aguayo, P.A. Martínez-Hernández, J.G. García Muñiz 2008. Influence of doe exposure and season on reaction time and semen quality of male rabbits. In: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress- June 10-13, Verona, Italy.* pp. 443-448.
- Rodríguez De Lara, R., C. Herrera, M. Fallas, R. Rangel, V. Mariscal, P. A. Martínez, J. García. 2007. Influence of supplementary dietary sprouted whet on reproduction in artificially inseminated doe rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 145-155. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2006.04.055
- Rodríguez-De Lara, R., J. Noguez-Estrada, R. Rangel-Santos, J.G. García-Muñiz, P.A. Martínez-Hernández, M. Fallas-López, E. Siman-Maldonado. 2010. Controlled doe

- exposure as biostimulation of buck rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 122, 270-275.  
doi:10.1016/j.anireprosci.2010.09.002
- Sanders, E.H., P.D. Gardner, P.J. Berger, N.C. Negus. 1981. 6-Methoxybenzoxazolinone: A plant derivative that stimulates reproduction in *Microtus montanus*. *Science*. 214, 67-69.
- SAS, 2004. User's Guide Statistics (Release 9.1). SAS Institute, Cary, NC, USA
- Schadler, M.H., B.J. Butterstein, B.J. Faulkner, S.C. Rice, L.A. Weisinger. 1988. The plant metabolite, 6-methoxybenzoxazolinone, stimulates an increase in secretion of follicle-stimulating hormone and size of reproductive organs in *Microtus pinetorum*. *Biol. Reprod.* 38, 817-820.
- Sigma- Aldrich®. 2016a. 6-methoxy-benzoxzolinone.  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/543551?lang=es&region=M>  
X consultado: 01 marzo 2016.
- Sigma- Aldrich®. 2016b. Metionin.  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m5250?lang=es&region=MX>  
consultado: 01 marzo 2016.
- Szendrő, Z., K. Szendrő, A.D. Zotte. 2012. Management of Reproduction on Small, Medium and Large Rabbit Farms: A Review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 25, 738–748. doi:10.5713/ajas.2012.12015
- Tang, Ch., S.H. Chang, D. Hoo, K.L., Yanagihara. 1975. Gas chromatographic determination of 2 (3)-benzoxazolinone from cereal plants. *Phytochemistry*. 14: 2077-2079.

- Theau-Clément, M. 2000. Advances in biostimulation methods applied to rabbit reproduction. In Procc. 7<sup>th</sup> World Rabbit Congress. Valencia, España. A: 61-79.
- Theau-Clément, M. 2007. Preparation of the rabbit doe to insemination: a review. *World Rabbit Sci.* 15, 61–80.
- Theau-Clément, M., J.M. Brun, E. Sabbioni, C. Castellini, T. Renieri, U. Besenfelder, J. Falières, J. Esparbié, G. Saleil. 2003. Comparision de la production spermatique de trois sou ches de lapins: moyennes et variabilités. In Proc. 10èmes Journées Recherche Cunicole, November 2003, Paris, France, 81-84.
- Theau-Clément, M., P. Lattaioli, A. Roustan, C. Castellini. 1996. A comparison between computerized semen image analyses and visual methods to evaluate various biological parameters in rabbit semen. 6<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Toulouse, 2, 133-137.
- Theau-Clément, M., A., Tircazes, G. Saleil, D. Monniaux, L. Bodín, J.M. Brun. 2015. Preliminary study of the individual variability of the sexual receptivity of rabbit does. *World Rabbit Sci.* 23, 163. doi:10.4995/wrs.2015.3471.
- Urbanski, H.F., S.O. Kim, M.L. Connolly. 1990. Influence of photoperiod and 6-methoxybenzoxazolinone on the reproductive axis of inbred LSH/Ss Lak male hamsters. *J. Reprod. Fert.* 90, 157-163.
- US Patent 5112843. 1992. Arthropodicidal use of 6-methoxy-2-benzoxazolinone to attract and control corn rootworm (*Diabrotica*).
- US Patent 7541356. 2009. Compounds for use in weight loss and appetite suppression in humans.

- Vanecek J. 1999. Inhibitory effect of melatonin on GnRH-induced LH release. *Reviews of Reproduction*, 4, 67-72.
- Vaughan, M.K., J.C. Little, G.M. Vaughan, R.J. Reiter. 1988. Hormonal consequences of subcutaneous 6-methoxy-2-benzoxazolinone pellets or injections in prepubertal male and female rats. *J. Reprod. Fertil.* 83, 859–866.
- Vilchez T., N. Luengo. 1994. Administración intramuscular y subcutánea. Capítulo 10. En: Santos Ramos B., M.D. Guerrero Aznar. Administración de medicamentos: Teoría y práctica. Ediciones Díaz de Santos. 193 -216.
- Viudes de Castro M.P., F. Marco-Jiménez, J.S. Vicente, E. Navarro, R. Lavara, E. Mocé. 2004. Sperm kinetic parameters and differences in seminal plasma composition among two rabbit lines. In Proc. 8th Annual Conf. European Society of Domestic Animal Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 394. 266 Abstract (P13). Warsaw Agricultural University, Poland.
- Wahlroos, O., A.I. Virtanen. 1958. On the antifungal effect of benzazolinone and 6-methoxybenzazolinone, respectively on *Fusarium nivale*. *Acta Chem. Scand.* 12: 124-128.
- Walton, A. 1945. Notes on the Technique of Artificial Insemination. The Holborn Surgical Instrument Co. Ltd., London.
- Wuttke, W. 1993. “Endocrinología” en: Schmidt, R. R., Thews, G. *Fisiología Humana*. Interamericana McGraw Hill. 24 Ed. 402-431.
- Yuwiler, A., W.D. Winters. 1985. Effects of 6-methoxy-2-benzoxazolinone on the pineal melatonin generating system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233, 45–50.

Zaniboni, L., T. Gliozzi, A. Maldjian, F. Luzi, S. Cerolini. 2004. Fatty acid and tocopherol composition of semen components in the rabbit. In Proc. 8th World Rabbit Congress, September, Puebla, Mexico, 365-370.

Zhang, B.R., B. Larson, N. Lundeheim, H. Rodríguez-Martínez. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI Bulls. *Int. J. Androl.* 21, 207-216.